การควบคุมเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธี

BIOCONTROL OF *Lasiodiplodia* spp., THE FUNGAL CAUSATIVE AGENTS OF POSTHARVEST DISEASES

กาญจนา นิรภัย

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2551

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การควบคุมเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธี

BIOCONTROL OF *Lasiodiplodia* spp., THE FUNGAL CAUSATIVE AGENTS OF POSTHARVEST DISEASES

กาญจนา นิรภัย

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
2551
©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การควบคุมเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธี

กาญจนา นิรภัย

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
2551

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิชชา สอาดสุด)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกชัย ชูเกียรติโรจน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุราภรณ์ สอาดสุด)

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกชัย ชูเกียรติโรจน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ให้ความช่วยเหลือ จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีรวมถึงผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิชชา สอาดสุด และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุราภรณ์ สอาดสุด ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ อาจารย์ สยาม ภพลือชัย สำหรับความช่วยเหลือในการสกัด Genomic DNA และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย และ ขอขอบคุณ Dr. Steven E. Massey, Department of Molecular Biology, University of Wyoming สำหรับความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย

ขอขอบคุณ ดร. สุวรรณา เดชาทัย สำหรับคำแนะนำในการวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยเทคนิค GC-MS รวมถึงศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ช่วยเหลือให้การทำงานสะดวกและราบรื่นด้วยดี

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และสมาชิกครอบครัวผู้เขียนสำหรับกำลังใจที่มอบให้ รวมทั้งกำลังใจและความช่วยเหลือจากเพื่อนทุกคนที่เป็นแรงผลักดัน สนับสนุน ช่วยเหลือให้ประสบความสำเร็จได้ในที่สุด

กาญจนา นิรภัย

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การควบคุมเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธี

ชื่อผู้เขียน นางสาวกาญจนา นิรภัย

หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกชัย ชูเกียรติโรจน์ ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุราภรณ์ สอาดสุด กรรมการ

บทคัดย่อ

ผู้วิจัยได้ทำการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* จากแหล่งธรรมชาติสามแหล่งคือ ถั่วเน่า ดินบริเวณรากพืชสมุนไพร และ ผิวของผลลำไย ทั้งหมด 284 ไอโซเลท จากการทดสอบขั้นต้นโดยใช้เทคนิค dual culture test พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 43 ไอโซเลท โดยมีร้อยละของการยับยั้งอยู่ระหว่าง 25.0 - 67.5 และเมื่อนำมาทดสอบซ้ำโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหาร nutrient broth (37°C, pH 7) แล้วทำการปั่นแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ที่แยกมาจากผลลำไย พบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญลดลงและบางไอโซเลทไม่เกิดการยับยั้งโดยมีร้อยละของการยับยั้งอยู่ระหว่าง 0.0 - 52.4 จากการสังเกตพบว่าการยับยั้งของเชื้อปฏิปักษ์เกิดขึ้นจากเซลล์ของแบคทีเรียที่ยังเหลืออยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองพบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งเกิดขึ้นได้จากการสร้างสาร antifungal compounds ของเซลล์แบคทีเรียบนอาหารแข็ง คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสูงที่สุด คือ TN79, RS5 และ CMU2 มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ ค่า pH 7

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ตัวแทนจากสามแหล่งจำนวน 3 ไอโซเลทคือ RS5, TN79 และ CMU2 บนอาหารแข็งเป็นเวลาอย่างน้อยสองอาทิตย์ จากนั้นสกัดสาร secondary

metabolite ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อราโดยใช้สารสกัดหยาบดังกล่าว พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 31.82 - 37.60 และยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* ได้มากที่สุดถึงร้อยละ 50.85 เมื่อทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า มีความเสถียรต่อ proteinase K (1 mg/ml) แสงอัลตราไวโอเลต (254 นาโนเมตร) อุณหภูมิในช่วงกว้าง (37 - 80 องศาเซลเซียส) แต่ไม่สามารถรักษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เมื่อนำไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclaving) นอกจากนี้แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสามไอโซเลท และสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งเชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์อื่นได้อีกสี่สายพันธุ์ คือ LP1, LP2, LG2 และ Type strain1120 และจากการวิเคราะห์สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทด้วยเครื่องมือ GC-MS สามารถแยกสารประกอบออกได้มากกว่าห้าสิบชนิด โดยสามารถยืนยันชนิดและระบุชื่อสารได้แน่นอนถึงร้อยละ 99 สองชนิดคือ Octadec-9-enoic acid และ trans-Oleic acid ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทกรดไขมันไม่อิ่มตัว อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกสารบริสุทธิ์มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้

จากการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 ด้วยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี ทดสอบด้วยชุดทดสอบแบคทีเรีย API 50 CHB/E kits (bioMérieux) และ BLAST search โดยใช้ลำดับของ 16S rRNA gene พบว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีความใกล้เคียงกับ *B. amyloliquefaciens* มากที่สุดที่ร้อยละ 99.9 ส่วนแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 และ CMU2 นั้น เมื่อดูจากผลการ BLAST จะเห็นได้ว่ามีความใกล้เคียงกับ *B. subtilis* มากถึงร้อยละ 96.17 และ 99.6 ตามลำดับ

คำสำคัญ : *Lasiodiplodia* spp./ แบคทีเรียปฏิปักษ์/ การควบคุมโดยชีววิธี/ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

Thesis Title Biocontrol of *Lasiodiplodia* spp., the Fungal Causative Agents of Postharvest Diseases

Author Miss Kanjana Niraphai

Degree Master of Science (Biotechnology)

Supervisory Committee Asst. Prof. Dr. Ekachai Chukeatirote Chairperson

Asst. Prof. Dr. Uraporn Sardsud Member

ABSTRACT

A total of 284 bacterial isolates were screened from *thua nao*, rhizosphere soil and surface of Longan fruit to test for their antagonistic ability against *Lasiodiplodia theobromae*. Of these, 43 strains of bacteria were capable of inhibiting mycelium growth (25 - 67.5%) by using dual culture plate test. The antagonistic activity of 43 strains was further tested by using supernatant collected from nutrient broth culture of bacteria (pH 7, 37°C). Interestingly, only the culture supernatants that still had bacterial cells were able to inhibit mycelial growth of the fungal strain (0 - 52.4%) In addition, it was showed that the filter-sterilized culture supernatants could not inhibit the fungal mycelium. Due to superior inhibitory activity, the bacteria strains TN79, RS5 and CMU2 were selected for further study. For optimal condition, it was found that pH 7 and 37°C were the most effective condition.

Subsequently, the antifungal compounds of TN79, RS5 and CMU2 were extracted from the 2-week nutrient agar culture using phosphate buffer pH 7.0. The extracts could inhibit mycelial growth of *L. theobromae* CMUL (31.82 - 37.60%) and other strains including LP1, LP2, LG2 and type strain No.1120 (17.39 - 33.33%). Besides, the extracts also affected conidial germination of *L. theobromae* CMUL up to 50.85% (RS5). The extracts remained active when exposed to UV light (254 nm) up to 1 hour and to proteinase K (1mg/ml). In addition, the extracts

were active over a wide range of pH (6 - 9) and temperature (37 - 80°C). However, autoclaving treatment (121°C, 15 min) completely destroyed the antifungal activity. When analyzed by GC-MS, total ion chromatogram showed more than 50 compounds for each strain and only two unsaturated fatty acids, octadec-9-enoic acid and trans-oleic acid, from 9 compounds were in agreement based on the level of acceptation quality value at 99%.

For bacterial identification, based on bacterial morphological characteristic, biochemical characteristic and API 50 CH kit, TN79, RS5 and CMU2 were identified as *Bacillus subtilis* / *B. amyloliquefaciens*. Based on BLAST search of 16S rRNA genes sequencing, TN79 was closely related to *B. amyloliquefaciens* (99.90%). RS5 and CMU2 were most closely related to *B. subtilis* (96. 17 and 99.6%)

Keywords : *Lasiodiplodia* spp./ antagonistic bacteria/ biocontrol/ antifungal compounds.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฑ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับ	3
2 แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*	4
2.2 โรคที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* และการเข้าทำลาย	10
2.3 การควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae*	14
2.4 การควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธี	16
2.5 กลไกการทำงานของการควบคุมโดยชีววิธี	25
2.6 การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* โดยชีววิธี	36
3 วิธีการดำเนินการวิจัย	38
3.1 สายพันธุ์เชื้อรา *L. theobromae* และการเก็บรักษาสายพันธุ์	38
3.2 สายพันธุ์แบคทีเรียและการเก็บรักษาสายพันธุ์	38

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 การทดสอบ pathogenicity ของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL กับผลลำไย	39
3.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยแบคทีเรีย	40
3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมกับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของแบคทีเรีย	41
3.6 การสกัดสารยับยั้งเชื้อราจากแบคทีเรียโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง	42
3.7 การทดสอบความเสถียรของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย	42
3.8 การทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราโดยใช้สารสกัดจากแบคทีเรีย	43
3.9 การตรวจสอบชนิดของสารสกัดจากแบคทีเรียโดยใช้เครื่อง GC-MS	44
3.10การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี	45
4 การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae*	48
4.1 ผลการทดสอบ pathogenicity ของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL กับผลลำไย	48
4.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ด้วยแบคทีเรียที่แยกจากถั่วเน่า ดินบริเวณรากพืชสมุนไพรและ แบคทีเรียจากผิวของผลลำไย	50
4.3 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์อื่นๆ	57
4.4 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารของแบคทีเรียเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ กัน	59
4.5 อภิปรายผล	60
5 การทดสอบความเสถียรและการตรวจสอบชนิดของสารสกัดจากแบคทีเรีย	65
5.1 การทดสอบความเสถียรของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย	65
5.2 การทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยใช้สารสกัดจากแบคทีเรีย	72

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.3 การตรวจสอบชนิดของสารสกัดจากแบคทีเรีย gas chromatography - mass spectrometry	73
5.4 อภิปรายผล	75
6 การระบุชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TN79, RS5 และ CMU2	79
6.1 การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา	79
6.2 การตรวจสอบทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกแบคทีเรีย	81
6.3 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ API 50 CHB/E kits (bioMérieux)	83
6.4 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ 16S rRNA gene sequence	86
6.5 อภิปรายผล	90
7 สรุปผลการทดลอง	93
เอกสารอ้างอิง	95
ภาคผนวก	108
ภาคผนวก ก เทคนิคการย้อมสีและการเตรียม Mc Farland standard	108
ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายทดสอบ และ บัฟเฟอร์	117
ภาคผนวก ค องค์ประกอบของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียสายพันธุ์ TN79, RS5 และ CMU2	123
ภาคผนวก ง ข้อมูลเชิงตัวเลขแสดงค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ที่สภาวะทดสอบต่างๆ	133
ภาคผนวก จ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ TN79, RS5 และ CMU2	136
ภาคผนวก ฉ ผลงานตีพิมพ์ / การนำเสนอผลงาน	139

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ประวัติผู้เขียน	147

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	โรคของพืชที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae*	13
2.2	เชื้อก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดต่างๆ	19
2.3	Biocontrol product ที่มีการจัดจำหน่ายทางการค้าในประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 2003	23
4.1	การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยสรุปจากแบคทีเรียทั้งสามแหล่งในการทดสอบ	
4.2	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL เป็นร้อยละโดยใช้เซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่แยกได้จาก ถั่วเน่า ดิน และผิวของผลลำไยโดยวิธี dual culture test จากแบคทีเรียที่คัดเลือกมาแล้วจากการทดสอบขั้นต้น 43 ไอโซเลท	54
4.3	การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเซลล์ของแบคทีเรีย	58
4.4	การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยสารสกัดจากแบคทีเรีย	58
5.1	สารประกอบที่เหมือนกันของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียสามชนิดและร้อยละในเชิงคุณภาพเมื่อเทียบกับฐานข้อมูล	75
6.1	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียตัวแทนทั้ง 9 ไอโซเลท	82
6.2	ผลการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TN79, RS5 และ CMU2 โดยใช้ API 50 CHB/E kits (bioMérieux)	85
6.3	ผลการเปรียบเทียบ 16S rRNA genesของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้เทคนิค BLAST search	87
6.4	ผลการเปรียบเทียบ 16S rRNA genesของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้เทคนิค BLAST search	87
6.5	ผลการเปรียบเทียบ 16S rRNA genesของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้เทคนิค BLAST search	88
ค.1	สารประกอบที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 ด้วยเครื่องมือ GC-MS	124

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
ค.2	สารประกอบที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 ด้วยเครื่องมือ GC-MS	126
ค.3	สารประกอบที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 ด้วยเครื่องมือ GC-MS	129
ง.1	ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ (%เฉลี่ย ± SD)	134
ง.2	ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิต่างๆ (% เฉลี่ย ± SD)	134
ง.3	ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยสารสกัดจากแบคทีเรียหลังจากการนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ ต่างๆเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง (% เฉลี่ย ± SD)	134
ง.4	ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL เมื่อใช้สารสกัดที่ผ่านการเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง (% เฉลี่ย ± SD)	135
ง.5	ค่าการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยสารสกัดจากแบคทีเรียที่นำไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 30 นาที และ 1 ชั่วโมง (% เฉลี่ย ± SD)	135

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
2.1	อนุกรมวิธานของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*	4
2.2	ลักษณะของ pycnidia ของเชื้อรา *L. theobromae*	7
2.3	กลุ่มก้อนของ immature conidia ที่ออกมาจากpycnidia บริเวณที่ติดเชื้อ(ซ้าย) และ mature conidia (ขวา)	7
2.4	(1) เส้นใย paraphyses, (2-3) conidiogenous cells และ conidia ที่ยังอ่อนอยู่, (4 -7) conidia แก่ แสดงให้เห็นริ้วของเม็ดสีชัดเจน (8 - 10) conidia ที่ยังอ่อนอยู่	8
2.5	การทดสอบโดยใช้ tissue culture plate เพื่อแสดงให้เห็นการแข่งขันเพื่อแย่งสารอาหารในการเจริญเติบโต ระหว่างจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และ จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช	30
2.6	การเกาะติดของเชื้อยีสต์ *P. guilliermondii* บนเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *B. cinerea* (ซ้าย) และ โพรงบนเส้นใยของเชื้อราก่อโรคที่เกิดจากเชื้อยีสต์ (ขวา)	33
2.7	เส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์ *P. nunn* แทงทะลุเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Phytophthora* sp.	34
2.8	(T) เส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* พันเป็นเกลียวรอบเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* (R) หลังจากเพาะเลี้ยงไว้ด้วยกันเป็นเวลา 2 วัน (ซ้าย) หลังจากผ่านไป 6 วันเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* เกิดอาการเหี่ยวอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่เส้นใยของ*T. harzianum* ยังมีลักษณะปกติ (ขวา)	35
3.1	การคำนวณหาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา	40
3.2	การวัดระยะการเจริญของเส้นใยของเชื้อราจากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราที่ 48 ชั่วโมง (ซ้าย) และ 18 – 19 ชั่วโมง (ขวา)	40
4.1	(ก) ลักษณะของเส้นใยของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหาร PDA (ข) เส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
4.2	mature conidia ของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ซึ่งไม่สร้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	49
4.3	ผลลำไยที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา (ซ้าย) ผลลำไยที่ปลูกเชื้อรา *L. theobromae* CMUL (ขวา)	49
4.4	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *L. theobromae* CMUL เมื่อทดสอบกับ (ก) เซลล์แบคทีเรีย (ข) เมื่อใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ และ (ค) เมื่อใช้น้ำเลี้ยงเชื้อหยดลงใน paper disc	53
4.5	(ก) การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อการสกัดสารยับยั้งเชื้อราบนอาหารวุ้นแข็งNA (ข) อาหารวุ้นซอยจนละเอียดก่อนนำไปสกัดสารยับยั้งเชื้อรา	56
4.6	(ก) การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อพบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (ข) การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยสารสกัดจากอาหารวุ้นแข็ง ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย	57
4.7	(ก) การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 1120 ด้วยเซลล์ของแบคทีเรียยับยั้งได้สูงสุดที่ร้อยละ 52.17 (ข) การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา LG2 ด้วยสารสกัดจากแบคทีเรีย TN79 ยับยั้งได้สูงสุดที่ร้อยละ 34.78	58
4.8	ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นร้อยละเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวช่วงอุณหภูมิที่ต่างกัน	59
4.9	ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นร้อยละ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรดด่างในช่วง pH 4 – 9	60
5.1	ค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเป็นร้อยละ เมื่อสกัดสารจากแบคทีเรียโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 5 - 9	66
5.2	ผลของค่า pH ของสารสกัดจากแบคทีเรีย TN79 ต่อเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยบริเวณที่ลูกศรชี้คือ ค่า pH เท่ากับ 7 จะเห็นได้ว่ามีการเว้าของเชื้อรามากกว่าที่ pH อื่นๆ (18 - 19 ชั่วโมง)	66
5.3	สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 นำไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
5.4	ค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเป็นร้อยละเมื่อนำสารสกัดจากแบคทีเรียไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ ต่างๆเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมงเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้นำไปให้ความร้อน	68
5.5	ค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเป็นร้อยละ เมื่อเติมเอนไซม์ลงในสารสกัดจากแบคทีเรียเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง	69
5.6	ค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเป็นร้อยละเมื่อนำสารสกัดจากแบคทีเรียไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลาสามสิบนาทีและหนึ่งชั่วโมงเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต	70
5.7	(ก) การเว้าของเส้นใยของเชื้อราเมื่อทดสอบกับสารสกัดจากแบคทีเรีย CMU2 ที่เติมเอนไซม์ proteinase K (ข) แสดงให้เห็นการเว้าของเส้นใยของเชื้อราเมื่อทดสอบกับสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย TN79 ที่นำไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 30 นาที	70
5.8	เส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ที่บ่มไว้นาน 2 วัน (ก) เส้นใยบริเวณที่สัมผัสกับสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย CMU2 เปลี่ยนเป็นสีดำยกเว้นสารสกัดที่ผ่านการ autoclaved (ข) สารสกัดจากแบคทีเรีย TN79 pH 7 มีบริเวณที่เป็นสีดำมากที่สุดเมื่อเทียบกับบริเวณที่หยดสารสกัดที่ pH 5	71
5.9	สปอร์ของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* CMUL (ก) สปอร์ที่ยังไม่งอก (ข) สปอร์เริ่มงอกเมื่อเวลาผ่านไป 1 - 2 ชั่วโมง และ (ค) สปอร์เริ่มงอกยาวขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง	72
5.10	ร้อยละของการงอกของสปอร์เมื่อเติมสารสกัดจากแบคทีเรียเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัดจากแบคทีเรีย	73
6.1	ลักษณะโคโลนีและลักษณะของเซลล์ที่ย้อมสีแกรมของแบคทีเรียตัวแทน 3 ไอโซเลท คือ TN79, RS5 และ CMU280	
6.2	การทดสอบทางชีวเคมี (ก) การทดสอบการใช้ซิเตรท (ข) การทดสอบการสร้างอินโดล (ค) การทดสอบการสร้างกรดจากน้ำตาล	81

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
6.3	การทดสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TN79 โดยใช้ API 50 CHB/E kits (bioMérieux, France) อ่านผลที่ได้จากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์โดยเมื่อมีการใช้คาร์โบไฮเดรตจะทำให้อาหารมีค่าเป็นกรดและเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ phenol red จากสีแดงเป็นสีเหลือง ยกเว้นการทดสอบ esculin ในหลอดที่ 25 ผลบวก คือจะเปลี่ยนสีของอาหารจากสีแดงเป็นสีดำ	84
6.4	phylogenetic tree แสดงผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของ 16S rRNA genes ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 กับ 16S rRNA genes database	89
ค.1	เปรียบเทียบผลการแยกสารประกอบของแบคทีเรีย TN79, RS5 และ CMU2 โดย GC-MS	132

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย

เชื้อราก่อโรค *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl (synonym *Botryodiplodia theobromae*) เป็นเชื้อราที่พบในเขตร้อนและกึ่งร้อน มักจะแยกเชื้อรานี้ได้จากผลไม้ที่มีอาการเน่าเสียและรอยด่างที่เปลือกของต้นไม้ (wood staining) (Summerbell *et al*., 2004) เชื้อรานี้สามารถก่อให้เกิดโรคในพืชได้มากกว่า 500 ชนิด (Cedeno *et al*., 1996) โดยเฉพาะโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของพืชเศรษฐกิจในเขตร้อนและเขตอบอุ่นอาทิเช่นโรค crown rot ของกล้วย (Mortuza and Ilag, 1999; Anthony *et al*., 2004) โรคเน่าของ มะม่วง พืชในตระกูลส้ม (Singh, 2000) เงาะ (ทัศนวรรณ ศรีวะอุไร และคณะ, 2547) ทุเรียน (สมศิริ แสงโชติ และคณะ, 2539) ลิ้นจี่ และ ลำไย (ประพันธ์ โอสถาพันธุ์ และคณะ, 2544) เป็นต้น ทำให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตร้อยละ 10 - 15 และอาจจะเพิ่มมากถึงร้อยละ 30 ในระหว่างการขนส่งและการเก็บรักษาหากไม่มีการจัดการที่ดีพอ

โดยเฉพาะลำไย (Longan: *Dimocapus longan* Lour.) ที่จัดเป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่สำคัญของประเทศไทย โดยมีแหล่งปลูกหลักที่สำคัญในเขตภาคเหนือ อาทิ จังหวัดลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง แพร่ และน่าน โดยในปี 2550 มีพื้นที่ปลูกลำไยทั่วประเทศรวม 1,009,830 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551) ลำไยเป็นผลไม้ที่มีศักยภาพในการส่งออกสูง โดยส่งออกทั้งในรูปลำไยสดแช่เย็น และผลิตภัณฑ์แปรรูป เช่น ลำไยอบแห้ง และลำไยบรรจุภาชนะอัดลม (พรพิมล และคณะ, 2546) ในปี 2550 มีการส่งออกลำไยและผลิตภัณฑ์รวม 286,789 ตันมีมูลค่ามากกว่า 5,000 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551) นอกจากนี้ยังมีการปลูกลำไยเพิ่มมากขึ้นในภูมิภาคอื่น ๆ ของประเทศไทยอีกด้วย (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2549)

การผลิตลำไยเพื่อการส่งออกนิยมส่งในลักษณะผลไม้สด เนื่องจากเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ในขณะที่การส่งออกลำไยในลักษณะผลิตภัณฑ์แปรรูปก็มีความสำคัญ โดยช่วยยืดอายุในการเก็บรักษา ตลอดจนมีส่วนช่วยให้ราคาไม่ตกต่ำมากในสภาวการณ์ที่มีผลผลิตของลำไยออกสู่

ตลาดมากเกินไป อย่างไรก็ตามปัญหาและอุปสรรคของการผลิตลำไยโดยเฉพาะลำไยสดออกสู่ตลาดคือการสูญเสียผลผลิตอันเนื่องมาจากการเน่าเสีย โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อราหลาย ๆ ชนิด เช่น *Aspergillus* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* spp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Nigrospora* spp. และ *Rhizopus oryzae* เป็นต้น (ประพันธ์ โอสถาพันธุ์ และคณะ, 2544)

จนถึงปัจจุบันการป้องกันและการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวบนผลลำไย ที่เกิดจากเชื้อราดังกล่าวสามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีบางชนิด เช่น acetaldehyde (วรุณรักษ์ ราศีนวล, 2539) และ sulphur dioxide (พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ, 2546) มาชุบผลลำไยหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถควบคุมโรคที่ได้ผล อย่างไรก็ตามพบว่ามีปัญหาเรื่องพิษตกค้างของสารเคมีในเนื้อลำไย และยังมีผลกระทบต่อกลิ่นและรสชาติของลำไยอีกด้วย นอกจากนี้ผลกระทบที่สำคัญอีกประการหนึ่ง ก็คือ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อราก่อโรคให้มีการต้านทานต่อการใช้สารเคมี

การควบคุมโรคด้วยชีววิธีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ควรจะให้ความสำคัญและเร่งศึกษาวิจัยถึงความเป็นไปได้ในการใช้เป็นมาตรการป้องกันและควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อประโยชน์และความปลอดภัยของผู้บริโภค ด้วยเหตุนี้เองการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถผลิตสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรค จึงเป็นอีกมาตรการหนึ่งที่สมควรได้รับการศึกษาวิจัย ตลอดจนได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวแทนการใช้สารเคมี ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมามีรายงานการวิจัยจำนวนมากที่ได้ศึกษาถึงการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวในพืชหลายชนิด เช่นการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae*, *P. fluorescens*, *P. cepacia* และ *Erwinia herbicola* ในการควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวของลิ้นจี่และลำไย (ประพันธ์ โอสถาพันธุ์ และคณะ, 2544) การใช้แบคทีเรียในกลุ่ม actinomycetes เช่น *Streptomyces plicatus* (Aghighi *et al*., 2004) การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคใบจุด ที่เกิดจากเชื้อ *Cercospora beticola* Sacc. เป็นต้น สำหรับการควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้ที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* โดยชีววิธีนั้น ยังมีการศึกษาและวิจัยอยู่จำกัด อาทิ งานของอุดม และคณะ (2548) ที่ใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมการเกิดโรคจากเชื้อราในเงาะ งานของสมศิริ แสงโชติ และคณะ (2548) ที่ใช้เชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคขั้วหวีเน่าบนกล้วยหอมทองและการใช้เชื้อ *Trichoderma* sp. ในการควบคุมโรคเน่าของกล้วยเช่นกัน (Mortuza and Ilag, 1999) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาเพิ่มเติมในการตรวจหาเชื้อปฏิปักษ์ตามธรรมชาติที่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. theobromae* เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาแทนการใช้สารเคมีหรือยาฆ่าเชื้อราได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้เมืองร้อน

1.2.2 เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและความเสถียรของสารสกัดจากจุลินทรีย์ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ได้

1.3 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ได้แก่ ดินบริเวณรากพืชสมุนไพร จุลินทรีย์ที่ได้จากผิวของผลลำไย และตัวอย่างอาหารหมักดอง เช่น ถั่วเน่า ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *L. theobromae* จากนั้นจึงคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารอินทรีย์ หรือสารเคมีที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *L. theobromae* ได้ดีที่สุด นำมาตรวจสอบว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดใด ทำการทดสอบความเสถียรของสารสกัดจากจุลินทรีย์ รวมถึงการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากจุลินทรีย์นั้นๆ

1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับ

ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ตลอดจนทราบข้อมูลพื้นฐานของสภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพของสารสกัดและชนิดของสารดังกล่าว

บทที่ 2

แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

2.1.1 การเรียกชื่อเชื้อราและการจัดจำแนก

เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl (syn. *Botryodiplodia theobromae* Pat.) เป็นเชื้อราที่มีความซับซ้อนในการตั้งชื่อ และมีชื่อเรียกได้หลายชื่อเนื่องจากมีรูปร่างได้หลายแบบ (pleomorphism) สามารถก่อให้เกิดโรคในพืชได้หลายชนิดกระจายทั่วไปในเขตร้อน ในปัจจุบันสามารถจัดลำดับขั้นทางอนุกรมวิธานของเชื้อราได้ดังต่อไปนี้ (ภาพที่ 2.1) (Sutton, 1980; Barnett and Hunter, 1987)

Kingdom Fungi

Division Amastigomycota

Subdivision Deuteromycotina

Class Deuteromycetes

Subclass Coelomycetidae

Order Sphaeropsidales

Family Sphaeropsidaceae

Genus *Lasiodiplodia*

Species *Lasiodiplodia theobromae*

ภาพที่ 2.1 อนุกรมวิธานของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

เดิมเชื้อรา *L. theobromae* ถูกจัดให้อยู่ใน Subdivision Ascomycotina, Class Ascomymycetes, Order Pleosporales Family Botryosphaeriaceae และ Genus *Botryosphaeria* โดยมีรายงานที่อ้างถึง teleomorph state ของเชื้อ *L. theobromae* ในชื่อว่า *Botryosphaeria rhodina* เริ่มจากในปี 1867 Curtis ได้แยกเชื้อ type material ของเชื้อรา *Physalospora rhodina* จากพืชที่ชื่อว่า *Rosa rubiginosa* และได้ระบุชื่อว่าเป็นเชื้อรา *Sphaeria rhodina* B.&C. และได้บันทึกไว้ใน catalogue ของหนังสือ “Geographical and natural history survey of North Carolina” แต่ไม่ได้ลงรายละเอียดเพิ่มเติมไว้แต่อย่างใด ต่อมาภายหลัง Cooke (Alves *et al*. 2008) ได้ให้คำนิยามอย่างเป็นทางการของเชื้อราเดียวกันนี้ไว้ในชื่อ *Physalospora rhodina* โดยอ้างอิงจากงานของ Berk และ Curtis (1867) และเนื่องจาก Cooke เป็นบุคคลแรกที่ได้ให้คำนิยามของราชนิดนี้ไว้ ดังนั้นในการอ้างอิงถึงราชนิดนี้ในชื่อ *P. rhodina* จึงอ้างถึงภายใต้ชื่อของ Cooke แต่เพียงผู้เดียว ต่อมาในปี 1970 Von Arx ได้บรรจุให้เชื้อราชนิดนี้อยู่ใน Genus *Botryosphaeria* ดังนั้นเชื้อราจึงได้รับการยอมรับในชื่อ *B. rhodina*

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของระยะ anamorph กับ teleomorph ของเชื้อรา *L. theobromae* โดยในปี 1925 Stevens ได้แยก ascospore ของเชื้อราที่ยังไม่ได้พิสูจน์แน่ชัดว่าเป็น *Physalospora gossypina* จาก cotton stems ในรัฐฟลอริดา และได้แยกเชื้อราในกลุ่มเดียวกับ ascomycete จากต้นไม้ชื่อ *Hicoria*, *Ilex*, *Liquidambar*, *Quercus* และ *Vitis* ในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเชื้อราที่แยกได้จากพืชทุกชนิดที่กล่าวมามีการสร้าง conidia ได้จากหนึ่ง ascospore ซึ่งเชื้อที่แยกมาได้ถูกพิสูจน์ในภายหลังว่านั้นเป็นเชื้อรา *L. theobromae* โดย Stevens (1926) เพราะฉะนั้น Stevens จึงเชื่อว่า *P. gossypina* แท้ที่จริงคือเชื้อราชนิดเดียวกันกับ *P. rhodina* ที่ถูกอ้างถึงโดย Cooke นั่นเอง อย่างไรก็ตาม ไม่ได้มีรายงานมาสนับสนุนงานวิจัยนี้เพิ่มเติมแต่อย่างใด

ในปี 1926 Stevens ได้ศึกษาระยะ perfect state ของเชื้อราก่อโรค stem end rot *Diplodia* ในพืชจำพวก *Citrus* และได้ระบุว่าเป็นเชื้อราใน Genus *Physalospora* และแยกเชื้อราชนิดเดียวกันได้จากพืชอีกสองชนิดคือ *Persea* และ *Rosa* จาก cultures ของเชื้อราที่แยกมาได้ Stevens สามารถเพาะเลี้ยง ascospore เดี่ยว ๆ ที่สามารถสร้าง conidia ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ conidia ของเชื้อรา *L. theobromae* หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งคือ *D. gossypina* ได้ แต่อย่างไรก็ตามมีเพียงรายงานของ Stevens เท่านั้นที่อ้างถึงระยะ teleomorph ของเชื้อรา *L. theobromae*

ในปี 2006 Crous และคณะ ได้ทำการศึกษาและแสดงให้เห็นว่าเชื้อราใน Family Botryosphaeriaceae นี้ยังมีความแตกต่างกันอยู่มากในระดับของ phylogenetic lineages ซึ่งเกี่ยวข้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา จากผลการศึกษาทำให้ Genus *Botryosphaeria* ถูกจำกัดให้มีเชื้อราเพียง 2 ชนิด คือ *B. dothidea* (Moug. : Fr.) Ces. & De Not. และ *B. corticis* (Dermaree & M.S. Wilcox) Von Arx & E. Müll. แสดงให้เห็นว่าเชื้อราใน Genus *Botryosphaeria* ไม่น่าจะเป็น teleomorph state ของเชื้อรา *L. theobromae* อีกต่อไป ดังนั้นในปี 2008 Alves และคณะที่ได้ทำการศึกษาด้าน สัณฐานวิทยา และ อณูพันธุศาสตร์ของเชื้อรา *L. theobromae* จึงได้ระบุชื่อเชื้อรา และ synonyms ของเชื้อราไว้ดังต่อไปนี้

Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maubl., Bull. trimest. Soc. Mycol. Fr. 25: 57 (1909)

≡ *Botryodiplodia theobromae* Pat., Bull. Soc. Mycol. Fr. 8: 136 (1892).

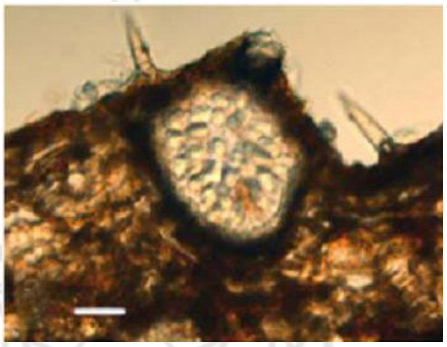
= *Diplodia gossypina* Cooke, Grevillea 7: 95 (1879).

นอกจากเชื้อ *L. theobromae* แล้ว เชื้อราในจีนัส *Lasiodiplodia* ยังมีการค้นพบเพิ่มขึ้นอีกหลายสปีชีส์เช่น ในปี 2004 Palvic และคณะได้รายงานเชื้อราที่ค้นพบใหม่ในชื่อ *L. gonubiensis* sp. nov. และในปี 2008 Alves และคณะก็ได้รายงานเพิ่มมาอีกสองสปีชีส์คือ *L. pseudotheobromae* sp. nov. และ *L. parva* sp. nov. โดยดูจากความแตกต่างของลักษณะของสปอร์ของเชื้อรารวมลักษณะทางพันธุศาสตร์ด้วย

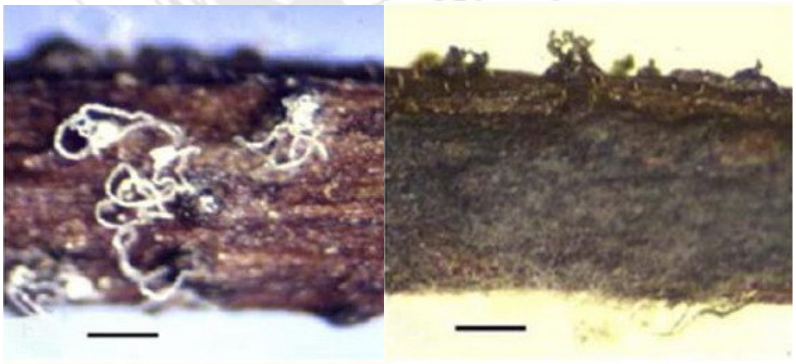
2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เชื้อรา *L. theobromae* เจริญได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar เส้นใยเมื่อยังอายุน้อยมีสีขาวละเอียดและค่อนข้างฟู ซึ่งจะเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน เมื่อโคโลนีแก่เส้นใยจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเทาดำ เส้นใยมีผนังกั้น มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยเส้นใยของเชื้อราเมื่ออายุมากจะสร้าง fruiting body ที่เรียกว่า conidiomata แบบ pycnidia ซึ่งอาจมีช่องเดียวหรือหลายช่องก็ได้ (ภาพที่ 2.2) (Singh, 2000; สุจิรา รวมเงาะ, 2543) ภายในประกอบด้วยเส้นใย paraphyses ใสไม่มีสี (hyaline) รูปร่างเป็นทรงกระบอก (cylindrical) มีผนังกั้น (septate) บางครั้งอาจพบว่ามีการแตกกิ่งก้านสาขา มี conidiogenous cells ใสไม่มีสีเช่นกัน ผนังเซลล์บางและเรียบ รูปร่างเป็นทรงกระบอก มีการแบ่งเซลล์แบบ holoblastic อาจมีการจัดเรียงเซลล์แบบเป็นปล้อง 1 - 2 ปล้อง (annellations) หรือเรียงตัวในระนาบเดียวกันเพื่อให้มีความหนาแน่นมากขึ้น (periclinal thickenings) (Alves *et al*., 2008; Cilliers *et al*., 1993) โดย conidiogenous cells จะมีหน้าที่ในการสร้าง conidia ซึ่งเป็น asexual spores โดยสร้างอยู่บนปลายของ conidiophores (Stover, 1972) ลักษณะของ conidia เมื่ออ่อนจะมีเพียงเซลล์เดียว ใสไม่มีสี

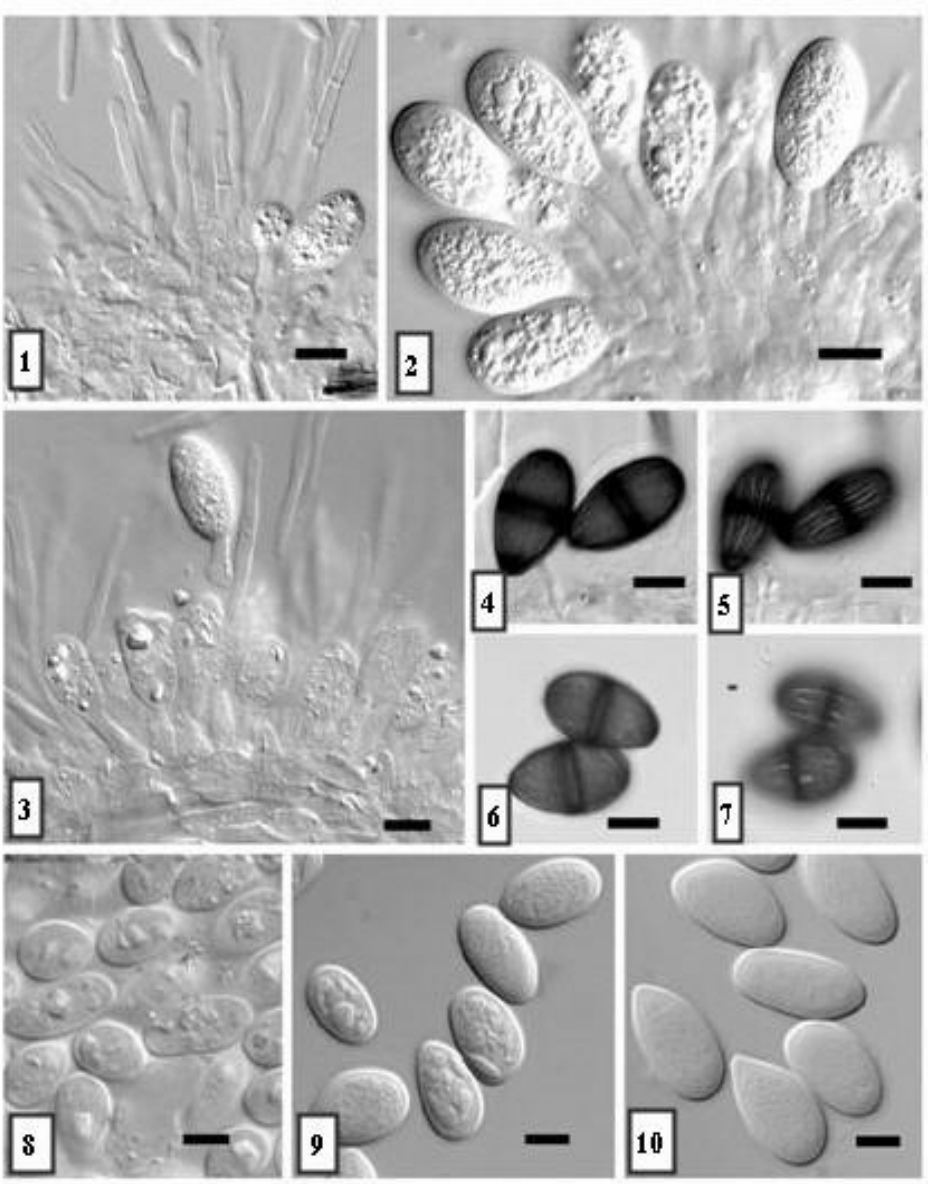
รูปร่างค่อนข้างรีจนถึงค่อนข้างกลม (subovoid to ellipsoid - ovoid) ปลายด้านหนึ่งกลมมน อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย บริเวณที่กว้างที่สุดของตัวเซลล์คือช่วงกลาง ไม่มีผนังกั้น ผนังเซลล์หนาและประกอบไปด้วย granular และผนังเซลล์จะยังคงไม่มีสีไปจนกว่าจะถูกปล่อยออกมาจาก pycnidia จากนั้น conidia จึงจะเริ่มสร้างเม็ดสี สีน้ำตาลเข้ม และสร้างผนังกั้น (septum) 1 ชั้นตรงกลาง ทำให้แบ่งออกเป็น 2 เซลล์ มีรูปร่างรีคล้ายไข่ มีขนาดประมาณ 26.2 - 27 x 14 - 14.4 ไมโครเมตร ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเห็นเป็นริ้วในแนวยาว (ภาพที่ 2.4) (Alves *et al*., 2008; Cilliers *et al*., 1993; สุมิตรา แสงวนิชย์, 2547)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะของ Pycnidium ของเชื้อรา *L. theobromae* (บาร์เท่ากับ 40 ไมโครเมตร) (Sato *et al*., 2007)



ภาพที่ 2.3 กลุ่มก้อนของ immature conidia ที่ออกมาจากpycnidia บริเวณที่ติดเชื้อ (ซ้าย) และ mature conidia (ขวา) (บาร์เท่ากับ 1 มิลลิเมตร) (Sato *et al*., 2007)



ภาพที่ 2.4 (1) เส้นใย paraphyses, (2-3) Conidiogenous cells และ conidia ที่ยังอ่อนอยู่, (4 - 7) conidia แก่ แสดงให้เห็นริ้วของเม็ดสีชัดเจน (8 - 10) conidia ที่ยังอ่อนอยู่ (บาร์มีค่าเท่ากับ 10 ไมโครเมตร) (Alves *et al*., 2008)

2.1.3 ปัจจัยต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *L. theobromae*

ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *L. theobromae* มีหลายอย่างเช่น แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ค่า pH อุณหภูมิ และ แสง โดยแหล่งคาร์บอนจะช่วยเร่งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา เส้นใยจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส มอลโตส และแป้ง แต่เจริญได้น้อยในอาหารที่มีน้ำตาลฟรักโตส ไซโลส และ เซลลูโลส นอกจากนี้เชื้อรา *L. theobromae* ยังเจริญได้ดีในแหล่งที่มีไนโตรเจนเป็นเคซีน ไฮโดรไลเซท โพแทสเซียมไนเตรท และ แอลแอสพาราจีนแต่เจริญได้น้อยใน ดี ฟีนิลอาลานีน และ แอล เมธิโอนีน และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราจะอยู่ในช่วง pH 4 - 5 และ 7.1 (สุมิตรา แสงวนิชย์, 2547)

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 24 - 30 องศาเซลเซียส ในธรรมชาติอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อรา *L. theobromae* สามารถเจริญและก่อให้เกิดโรคในพืชได้ จะเท่ากับ 31.5 องศาเซลเซียส และต่ำสุดคือ 25.9 องศาเซลเซียส (Singh, 2000)

แสงหรือช่วงเวลาในการรับแสงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลมากที่สุดต่อการสร้างหรือไม่สร้าง pycnidia ของเชื้อรา *L. theobromae* เพราะเชื้อรา *L. theobromae* จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อราที่ตอบสนองต่อแสง near UV และแสงสีน้ำเงิน ระยะเวลารับแสงที่ดีที่สุดที่จะทำให้เกิดการสร้าง pycnidia คือ 16 ชั่วโมงต่อวัน และหากได้รับแสงน้อยกว่า 4 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะนานเกิน 23 วัน จะทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา (Cilliers, 1993) แสงที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่จะช่วยกระตุ้นการสร้าง pycnidia คือ 15 ฟุตเทียนต่อเนื่องกันเป็นเวลา 4 วัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้น การสร้าง pycnidia จะมากขึ้นและจะคงที่ที่ความเข้มข้นของแสง 180 ฟุตเทียน ทั้งนี้แสงมีผลต่อการสร้าง pycnidia และ สปอร์ของเชื้อรา แต่ไม่มีผลการการเจริญของเส้นใยของเชื้อราแต่อย่างใด (สุมิตรา แสงวนิชย์, 2547)

การสร้างสปอร์หรือ conidia ของเชื้อรา *L. theobromae* เกิดขึ้นได้ยากหรือไม่เกิดขึ้นเลยบนอาหาร PDA ปกติ แต่ในการจัดจำแนกเชื้อราใน Class Deuteromycetes ซึ่งลักษณะเด่นคือการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นจะใช้ลักษณะของสปอร์และการสร้างสปอร์เป็นสำคัญ (Baird, 2004) ซึ่งการชักนำให้เกิดการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* อาจทำได้โดยการเพาะเลี้ยงราบนผลไม้ที่เป็น host ตามธรรมชาติ เช่นบนผลกล้วย ผลชมพู่ (อุดม ฟ้ารุ่งสาง และคณะ, 2548) และทิ้งไว้จนผลไม้มีลักษณะเป็นมัมมี่ คือผิวแห้ง แข็งและมีสีดำ conidiomata จะถูกสร้างขึ้นและฝังตัวอยู่ใน host เพื่อรอที่จะปล่อย mature conidia ออกมาเมื่อถึงเวลาที่เหมาะสม (ภาพที่ 2.3) อย่างไรก็

ตามมีรายงานการชักนำให้เกิดสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้เช่นกัน โดยเติมชิ้นส่วนของ host ของเชื้อราลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Alves (2008) ใช้การเติม poplar twigs ที่ปราศจากเชื้อลงใน 2% water agar บ่มที่อุณหภูมิห้องและให้รับแสงธรรมชาติ Palvic (2004) ชักนำให้เกิดสปอร์โดยการเติม pine needles ที่ปราศจากเชื้อ ลงในอาหาร 2% malt extract agar บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส และให้รับแสง แบบ near UV light จึงจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ได้

2.2 โรคที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* และการเข้าทำลาย

เชื้อรา *L. theobromae* สามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชได้มากกว่า 500 ชนิด (Cedeno *et al*., 1996) กระจายอยู่ทั่วทุกภูมิภาคของโลกและพบได้มากที่สุดในเขตร้อนและกึ่งร้อน (ตารางที่ 2.1) เชื้อราชนิดนี้เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดโรคในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวซึ่งส่วนใหญ่จะอ่อนแอต่อจุลินทรีย์สาเหตุโรคทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางด้านการเกษตรอย่างมาก โรคพืชที่พบหลังเก็บเกี่ยวมักมีสาเหตุจากเชื้อโรคแอบแฝงในระยะแปลงปลูกตั้งแต่ในระยะติดดอกแต่จะยังไม่แสดงอาการให้ปรากฏ ลักษณะอาการของโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวจะปรากฏให้เห็นในขั้นตอนใดก็ได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อโรคนั้นๆ การเข้าทำลายหลังการเก็บเกี่ยวของเชื้อรา *L. theobromae* จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดแผลใดๆ ที่ผิวของผลไม้ โดยเชื้อราจะเข้าทำลายทางบาดแผล สปอร์ของเชื้อราอาจจะติดมากับผิวผลไม้ กิ่ง ก้าน หรือ บริเวณขั้วผลมาตั้งแต่อยู่ในสวนหรือแปลงปลูก และสามารถเข้าทำลายผลไม้ทางรอยตัดบริเวณขั้วผล โดยเฉพาะเมื่อผลไม้เริ่มสุก การลุกลามของเชื้อราจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและลามไปทั่วทั้งผล ทำให้เกิดผลเน่า บางครั้งพบ fruiting body ของเชื้อราเป็นจุดดำบนแผลของผลไม้ (สารสนเทศอารักขาพืช, 2551; ดนัย บุญเกียรติ, 2534) โรคพืชที่หลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* ในผลไม้และพืชชนิดต่างๆ นอกเหนือจากลำไยได้แก่

โรค stem end rot โดยเป็นเชื้อราสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคนี้ในผลไม้หลายชนิดเช่น ในอาโวคาโด เชื้อราสามารถมีชีวิตอยู่ได้บนใบไม้แห้งและตามกิ่งก้านของต้นอาโวคาโดและสร้างสปอร์ออกมาเป็นจำนวนมาก ในช่วงฤดูฝนสปอร์ของเชื้อราส่วนหนึ่งจะถูกพัดพาไปติดอยู่บนผลอาโวคาโด ขอบเขตของการระบาดของเชื้อราจะขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมทางธรรมชาติ โดยเชื้อรา *L. theobromae* จะเจริญงอกงามได้ดีในภาวะที่อากาศร้อน สปอร์ของเชื้อราเหล่านี้จะยังไม่ทำ

อันตรายแก่ผลอโวคาโดจนกว่าจะถึงระยะที่เหมาะสมคือ เมื่อผลเริ่มสุกและเนื้อผลไม้เริ่มจะนิ่ม (Marais, 2004) ในมะละกอการเกิดโรค stem end rot จะเกิดขึ้นในระยะหลังการเก็บเกี่ยวเช่นกัน โดยการเข้าทำลายจะเริ่มตั้งแต่ผลเริ่มสุก เส้นใยของเชื้อราจะเจริญปกคลุมไปทั่วทั้งผล และลามเข้าไปถึงเนื้อใน ผลจะเริ่มเน่า ฉ่ำน้ำและผิวเหี่ยว เมื่อตัดผลมะละกอตามยาวจะเห็นเนื้อเยื่อข้างในจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ลามมาถึงผิวนอกและแห้งแข็งในที่สุด อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญบนผลมะละกอคือ 30 องศาเซลเซียส กอปรกับมีความชื้นร่วมด้วย นอกจากจะก่อโรคในผลมะละกอแล้ว ยังมีรายงานการก่อให้เกิดโรคเน่ากับต้นมะละกอ “Sunrise solo” ในประเทศ บราซิลอีกด้วย (Ventura *et al*., 2004) โรค stem end rot ในพืชตระกูลส้มก็เช่นกัน เมื่อติดเชื้อเปลือกผลไม้จะนิ่มและบางลง สีเปลือกจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล เมื่อผ่าออกจะเห็นอาการเน่าลามไปถึงแกนผล และขอบของ ถุงน้ำ (juice sacs) เมื่อปล่อยทิ้งไว้ก็จะนิ่มและเน่าไปทั่วทั้งผล การเกิดโรค stem end rot ในมะม่วงเชื้อราอาจติดมากับใบกล้วยแห้งที่ใช้รองมะม่วงในขณะขนส่ง โดยการเข้าทำลายจะเข้าทำลายที่บาดแผลบริเวณขั้วผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว (Singh, 2000) ทำให้เกิดรอยช้ำสีน้ำตาลเข้มไปจนถึงสีดำเห็นขอบรอยช้ำชัดเจน บริเวณบาดแผลจะอ่อนนุ่ม ชื้นและเริ่มมีอาการเน่า ต่อมาเชื้อราจะสร้าง pycnidia สีดำ เป็นจำนวนมากมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (อุราภรณ์ สอาดสุด และคณะ, 2546) นอกจากนี้ยัง ก่อให้เกิดโรคผลเน่าของเงาะ โดยหลังจากการติดเชื้อรา ขนและเปลือกของเงาะจะมีอาการช้ำและเหี่ยวย่น ขนของเงาะจะเปลี่ยนสีเป็นสีดำ เกิดการสูญเสียน้ำหนักอย่างรวดเร็ว การติดเชื้อและการเข้าทำลายเป็นแบบแอบแฝงเช่นเดียวกับผลไม้ชนิดอื่น (ทัศนวรรณ ศรีวะอุไร และคณะ , 2547; อุดม ฟ้ารุ่งสาง และคณะ, 2548)

ก่อให้เกิดโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในทุเรียน โดยทุเรียนมักติดเชื้อมาตั้งแต่ในระยะแปลงปลูก เชื้อราจะคงความมีชีวิตบนผลทุเรียนที่ถูกตัดแต่งและทิ้งผลไว้ที่โคนต้นจนผลแก่เต็มที่ เชื้อรา *L. theobromae* ก่อโรคกับทุเรียนได้ดีและมีความรุนแรงของโรคสูง แผลในระยะแรกปรากฏเป็นรอยสีน้ำตาลมีลักษณะนิ่ม ต่อมาเมื่อแผลขยายมากขึ้น ปรากฏส่วนของเส้นใยของเชื้อสีเทาปนเขียวขึ้นฟูบริเวณแผล อาการเน่าจะลามบริเวณผิวลงไปจนถึงส่วนเนื้อของทุเรียน เชื้อราจะสร้าง pycnidia ฝังอยู่ในเนื้อเยื่อของเปลือก บริเวณที่เกิดอาการ โดยมีส่วนปากเปิดโผล่ออกมาจากบริเวณผิวเปลือก และปล่อย conidia สีดำ ออกมาบริเวณปากเปิดของ pycnidia ทำให้เห็นเป็นเขม่าสีดำ (สมศิริ แสงโชติ และคณะ, 2539; 2543)

ก่อให้เกิดโรค finger tip หรือ black tip rot และ crown rot ในกล้วย โดยเชื้อราจะเข้าไปทำลายผลกล้วยทางบาดแผลในระยะเก็บรักษา โรคนี้ระบาดในหลายประเทศ ได้แก่ อินเดีย อเมริกา

กลาง ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน ลักษณะเด่นของโรคคือจะมีเส้นใยสีเทาดำเจริญปกคลุมไปทั่ว การติดเชื้อจะติดเชื้อบริเวณบาดแผลสดหลังจากการตัดแต่งหวีกล้วยเส้นใยของเชื้อราจะเจริญบนแผลบริเวณรอยตัด และลามไปทั่วทั้งผลทำให้สีผิวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำจนถึงดำ ในกรณีของโรค crown rot จะเปลี่ยนขั้วหวีให้กลายเป็นสีดำ นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถบุกรุกเข้าทางบาดแผลหรือเนื้อเยื่อที่ฉีกขาด ลามเข้าไปจนถึงเนื้อกล้วยทำให้เนื้อผลไม้เปลี่ยนเป็นสีดำ ผิวด้านนอกส่วนที่ติดเชื้อจะกลายเป็นสีดำและแห้งแข็งพบมีการสร้าง pycnidia กระจายทั่ว เชื้อราเจริญอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ทำให้เกิดการเน่าเสียอย่างรวดเร็วภายใน 2 – 3 วัน (Alvindia, 2004; Anthony, 2002; Raut and Renade, 2004)

โรค soft watery rot ในฝรั่ง การติดเชื้อเริ่มจากผิวของฝรั่งมีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลช้ำ เริ่มตั้งแต่ปลายก้านลามไปเลื่อยๆ จนถึงด้านล่างของผลจนทั่วทั้งผล เมื่อทิ้งไว้จะมีการสร้าง pycnidia กระจายทั่วผิวเปลือกและเกิดอาการนิ่มและฉ่ำน้ำ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส การงอกของสปอร์จะเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงสุดไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส สปอร์ของเชื้อราจะไม่เกิดการงอก (Misra, 2004)

นอกจากการก่อให้เกิดโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้ เชื้อรา *L. theobromae* ยังสามารถก่อให้เกิดโรคกับส่วนอื่นๆของต้นไม้ได้ เช่น โรคยอดแห้งตาย (die - back) ซึ่งพืชที่ติดเชื้อโรคจะมีอาการแห้งตายที่เริ่มจากปลายยอด ปลายกิ่ง หรือปลายก้าน แล้วลุกลามมายังส่วนกิ่งก้านสาขาและลามมาถึงโคนต้นของพืช มักจะเกิดขึ้นในระยะที่ต้นไม้อยู่ในระยะพักตัว พบโรคระบาดนี้ได้ในสวนผลไม้เช่นสวนมะม่วงหรือในต้นไม้ประเภทสน (Srivastava and Mehra, 2004) และยังเป็นสาเหตุให้เกิดโรคยางไหล (gummosis) กับต้นไม้อีกหลายชนิด เช่น ในประเทศญี่ปุ่นก่อเกิดโรคยางไหลกับ ต้น peach และ apricot (Li, 1995) ในประเทศไทยพบโรคยางไหลเกิดกับต้นส้มเขียวหวาน ลักษณะอาการของโรคคือ โคนต้นมีน้ำยางสีน้ำตาลไหลออกมาเมื่อแกะเปลือกต้นไม้ออก บริเวณที่มียางไหลจะมีลักษณะเป็นแอ่งบุ๋ม เนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นโรคจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมียางแห้งแข็งเกาะที่ต้น มักจะพบยางไหลมากในตอนเช้าตรู่หรือฝนตก ต้นหรือกิ่งแสดงอาการยางไหลภายหลังจะเกิดเนื้อเยื่อเน่าลุกลามแห้งตาย ต้นส้มมีกิ่งตายเป็นหย่อมๆ เชื้อราเจริญลุกลามไปตามก้านผล หรือ ลามเข้าทางขั้วผล ทำให้ขั้วผลส้มเน่าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ต่อมาจะสร้าง pycnidium มากมาย พืชในตระกูลส้ม ได้แก่ ส้มโอ ส้มเขียวหวาน และ มะนาวมักแสดงอาการเป็นโรคนี้ การแพร่ระบาดสปอร์ของเชื้อราแพร่กระจายตามลม ฝน หรือ ติดไปกับเครื่องมือทางการเกษตร เชื้อโรคสามารถเข้าสู่แผลที่โคนต้นได้ โดยการกระเซ็นจากพื้นดิน หลังจากที่ทำให้กิ่งตาย

เชื้อราจะลุกลามสู่ผลส้มและทำให้ผลร่วง (สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร, 2551)

นอกจากนี้เชื้อรา *L. theobromae* ยังสามารถก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์ได้ด้วย โดยก่อให้เกิดโรคกระจกตาอักเสบจากเชื้อรา (keratitis), โรคเชื้อราที่เล็บ (onychomycosis) และโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อรา (subcutaneous phaeohyphomycosis) อีกด้วย โดยมีรายงานการติดเชื้อจากการเกิดบาดแผลที่สัมผัสกับส่วนของพืชเช่น ไม้ที่มีเชื้อราอยู่แต่พบได้ไม่มากนัก (Summerbell, 2004)

ตารางที่ 2.1 โรคของพืชที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae*

Hosts	Symptoms and signs	References
Hevea brasiliensis Mull. Arg.	Blue-strained timber,dieback	Fu *et al.* (1988); Narain and Dash (1989)
Pyrus spp.	Canker and dieback	Avtar *et al*. (1990)
Comus spp.	Cankers carrying conidia	Mullen *et al*. (1991)
Platanus occidentalis L.	Production of cankers	Filer (1969); Lewis *et al.* (1978)
Elaeagnus angustifolia L.	Bark, cambium and phloem tissue killed	Peterson (1976)
Aleurites montana Lour.	Canker disease	Large (1948)
Eucalyptus spp.	Root collar canker causing physiological wilting	Sharma *et al.* (1985); Soni *et al*. (1991)
Cajanus cajan. Huth.	Stem end rot	Jagdish and Pathak (1989)
Citrus reticulata. Blanco.	Twig gumming and dieback	Feder and Huchins (1966)
Carica papaya. L.	Fruit rot	Hunter *et al.* (1969)
Citrus aurantifolia Swingle., C. *sinensis* Osbeck	Gummosis and dieback	Singh *et al.* (1971)
Carica papaya. L.	Stem-end rot	Hunter *et al.* (1969)

ที่มา : Cillier *et el*. 1993

2.3 การควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae*

2.3.1 การควบคุมป้องกันด้วยวิธีทางกายภาพ

การควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวทางกายภาพนั้น อาจควบคุมโดยการใช้อุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิสูง การฉายรังสี รวมถึงการรักษาความสะอาดระหว่างการเก็บรักษา ตัวอย่างการใช้ความเย็นในการป้องกันไม่ให้เกิดการระบาดของโรคเช่น การเก็บรักษาผลฝรั่งที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae* ได้ แต่อาจมีปัญหาว่าหากเก็บรักษาผลฝรั่งที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสแล้วนำเอาออกมาที่อุณหภูมิปกติหรืออุณหภูมิห้อง อาจจะกลายเป็นการเพิ่มพูนอาการเน่าให้เกิดมากขึ้นได้ (Misra, 2004) การเก็บรักษาลำไยภายหลังการเก็บเกี่ยวที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถเก็บรักษาลำไยได้นานถึง 12 วันโดยที่คุณภาพของลำไยยังดีอยู่ (กัลยา วิธี, 2540) แต่อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้เชื้อราเจริญได้ช้าลงแต่ไม่สามารถกำจัดเชื้อสาเหตุที่ฝังตัวอยู่ในเนื้อเยื่อได้ เพียงแค่ชะลอการการสุกและการเสื่อมสภาพของผลไม้เท่านั้น การใช้อุณหภูมิสูงในการควบคุมโรคอาจจะใช้ในรูปของอากาศร้อน อากาศชื้นร้อน หรือ น้ำร้อน การใช้น้ำร้อนในการควบคุมการโรคของผลผลิตมีข้อได้เปรียบการใช้สารเคมีคือไม่มีสารพิษตกค้าง เช่นการควบคุมเชื้อรา *L. theobromae* ในผลมะละกอหลังการเก็บเกี่ยวสามารถใช้วิธีการจุ่มน้ำร้อนที่ 48 - 49 องศาเซลเซียสเป็นเวลายี่สิบนาทีก็สามารควบคุมได้ในระดับหนึ่ง (Singh, 2000; Ventura *et al*., 2004) แต่การใช้น้ำร้อนก็มีข้อเสียเช่นเดียวกับการใช้ความเย็นคือไม่สามารถมีผลในการควบคุมในระยะยาวได้ นอกจากนี้ผลไม้หลายชนิดไม่สามารถจะถูกน้ำได้ภายหลังการเก็บเกี่ยว เพราะจะทำให้เกิดความเสียหายเช่น ผลสตรอเบอรี่ ซึ่งอาจทดแทนด้วยการใช้ความร้อนชื้น หรือ การใช้รังสีในการควบคุมโรค แต่การใช้รังสีในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวนั้นไม่แพร่หลายและมักมีผลข้างเคียงต่อคุณภาพของผลิตผลเช่น การสุกที่ผิดปกติ การใช้รังสีกับผลไม้เมืองร้อนเช่น มะละกอ และมะม่วงให้ผลดีในแง่การป้องกันโรคแต่มักไม่คุ้มค่าเพราะมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก

2.3.2 การควบคุมป้องกันด้วยวิธีทางเคมี

การควบคุมโรคหลังเก็บเกี่ยวโดยวิธีทางเคมีนั้น นับว่าเป็นวิธีหนึ่งที่ให้ผลดีและประหยัดค่าใช้จ่าย การใช้สารเคมีอาจใช้ในรูปของการฉีดพ่น หรือ ใช้วิธีการจุ่มผลไม้ลงในสารเคมี ใช้แว๊กซ์เคลือบ หรือ ใช้การรมด้วยสารเคมีที่อยู่ในรูปก๊าซเป็นต้น การควบคุมโรคที่เกิดจาเชื้อรา *L. theobromae* โดยใช้สารเคมี อาทิเช่น การควบคุมเชื้อราในทุเรียน ใช้สาร imazalil เข้มข้น 500 ppm ชุบนาน 3 นาที จะให้ผลในการควบคุมโรคผลเน่าได้ดีที่สุดโดยลดความเสียหายลดจากร้อยละ 42

ลงมาเหลือเพียงร้อยละ 8 (สมศิริ แสงโชติ, 2539) การควบคุมโรคในฝรั่งหลังจากการเก็บเกี่ยวใช้วิธีจุ่มผลลงชุบสารเคมีเช่นกันโดยใช้สารเคมีสองชนิดคือ ชุบสาร imazalil เข้มข้น ร้อยละ 0.1 ก่อนแล้วจึงตามด้วย benomyl เข้มข้นร้อยละ 0.1 พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้สูงสุด (Singh, 2000) การควบคุมโรคในมะละกอ มีการใช้สารเคมีร่วมกับวิธีทางกายภาพได้แก่ ใช้ลมร้อนที่อุณหภูมิ 48.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานสามถึงสี่ชั่วโมง ร่วมกับการจุ่มหรือชุบผลด้วย thiabendazole (4 กรัม ต่อลิตร) (Singh, 2000) สามารถควบคุมโรคเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวได้ดี

ในประเทศไทยมีการควบคุมโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของลำไยโดยการรมด้วยก๊าซ sulferdioxide ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นระยะๆ ระหว่างการเก็บรักษา สามารถลดอาการเน่าเสียของผลลำไยทำให้สามารถเก็บรักษาลำไยได้นาน 1 - 1.5 เดือน แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีผลกระทบต่อผลลำไยคือ ทำให้เกิดอาการผิดปกติที่เปลือกด้านในของลำไยลักษณะมองเห็นเป็นวงสีน้ำตาล (กัลยา วิธี, 2540) นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานว่าการควบคุมด้วยการจุ่มผลลำไยในสาร acetaldehyde เข้มข้นร้อยละ 40 นาน 12 ชั่วโมง สามารถฆ่าเส้นใยของเชื้อราก่อโรคได้ แต่ไม่เหมาะที่จะใช้ในทางการค้า เนื่องจากระดับความเข้มข้นที่ใช้ได้ผลมีผลต่อคุณภาพของผลลำไยโดยทำให้สีเปลือกด้านในของผลมีสีเข้มขึ้นและเนื้อผลไม้เหลืองเข้มขึ้นเช่นกัน รวมถึงมีกลิ่นตกค้างในผลอีกด้วย (วรุณรักษ์ รายีนวล, 2539) ในพืชตระกูลส้มมีการควบคุมโดยใช้สารเคมีที่ชื่อ 2,4–dichlorophynoxyacetic acid แต่สารเคมีตัวนี้เป็นยาฆ่าเชื้อราที่มีความเป็นพิษสูงก่อให้เกิดอาการระคายเคืองผิวหนัง, ตา และระบบทางเดินหายใจ (Singh, 2000) หากใช้ในปริมาณมากอาจเป็นอันตรายต่อเกษตรกรได้ นอกจากนี้ยังมีสารเคมีอีกชนิดหนึ่งคือที่ใช้ควบคุมโรคในกล้วย คือ benomyl เข้มข้นร้อยละ 0.08 แต่ในปัจจุบัน US environment protection authority ได้ระบุว่าสาร benomyl อาจเป็นตัวการหนึ่งที่ก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ จึงเป็นปัญหาใหญ่ของการใช้สารเคมี และเป็นเหตุให้ในปัจจุบันมีความพยายามที่จะหาแนวทางใหม่เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อมนุษย์และมีผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อม

2.3.3 การจัดการสภาวะแวดล้อม

นอกจากการควบคุมทางด้านฟิสิกส์และเคมีแล้ว การจัดการสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมจะสามารถช่วยควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน การจัดการสภาวะแวดล้อมเช่นการควบคุมอุณหภูมิในห้องเก็บรักษาหรือระหว่างการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวให้มีระดับต่ำจะช่วยลดอัตราการเปลี่ยนแปลงทางเมตาโบลิซึมของทั้งผลไม้และเชื้อรา สามารถชะลอการสุกของผลไม้ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการอ่อนแอต่อโรคเน่า และควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ไม่ให้

เหมาะกับการเจริญของเชื้อราจะช่วยลดสาเหตุของการเกิดโรคเน่าอีกด้วย ความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงเกินไปประมาณร้อยละ 98 - 100 จะก่อให้เกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้มากที่สุดจึงควรควบคุมความชื้นในบรรยากาศของห้องเก็บรักษาให้อยู่ประมาณร้อยละ 95 นอกจากนี้การควบคุมสภาพบรรยากาศ ควบคุมปริมาณก๊าซออกซิเจน ให้ลดต่ำลงและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้สูงขึ้นจะช่วยลดปริมาณของโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้ โดยเฉพาะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณสูงจะช่วยลดการเจริญของเชื้อราได้มากขึ้น (ดนัย บุญเกียรติ, 2534)

2.4 การควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธี

2.4.1 ความหมายของการควบคุมโรคโดยชีววิธี (Biocontrol)

การควบคุมโรคโดยชีววิธี คือการใช้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่ไม่เป็นอันตรายต่อพืช กำจัดสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง โดยสิ่งมีชีวิตที่นำไปใช้กำจัดเป็นปรสิตต่อสิ่งมีชีวิตที่ต้องการทำลาย หรือไปต่อต้านขัดขวาง (antagonistic) การเจริญของสิ่งมีชีวิตที่เป็นปรสิตต่อพืช เช่น การใช้แบคทีเรียบางชนิดในการกำจัดแมลง หรือใช้ไวรัสกำจัดแมลง หรือใช้ไวรัสกำจัดแบคทีเรีย ใช้เชื้อราบางชนิดกำจัดไส้เดือนฝอยเป็นต้น (พิภพ ลำยอง, 2534) คำว่า biological control ได้ถูกบัญญัติขึ้นโดย Harry Smith จากมหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย ซึ่งให้คำนิยามว่าเป็นการลดจำนวนประชากรศัตรูพืชด้วยการกระตุ้นให้เกิดศัตรูตามธรรมชาติ จากนั้นจึงมีการนำประเด็นนี้มาถกเป็นวงกว้างทำให้เกิดคำจำกัดความหรือคำนิยามมากมายเกี่ยวกับการควบคุมโดยชีววิธี (Gnanamanickam *et al*., 2002)

ในปี ค.ศ. 1965 Garrett ได้ให้คำนิยามของการควบคุมโดยชีววิธีว่า “ในสภาวะแวดล้อมใดๆก็ตาม จุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตที่ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชลดปริมาณเป็นผลให้ลดความรุนแรงของโรคลงได้”

ในปี ค.ศ. 1972 Johnson and Curl ได้ให้คำนิยามของการควบคุมโดยชีววิธีว่า “การควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพรวม หมายถึง การลดลงของโรคและปริมาณเชื้อก่อโรค ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยการชักนำเชื้อจุลินทรีย์ตั้งแต่หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิดมาทำการยับยั้งเชื้อก่อโรค หรือ โดยการปรับสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคนั้นๆได้”

ในปี ค.ศ. 1974 Baker and Cook ได้ให้คำนิยามของการควบคุมโดยชีววิธีว่า “การใช้จุลินทรีย์หนึ่งหรือมากกว่ามาทำให้ปริมาณเชื้อโรค หรือกิจกรรมของเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชลดน้อยลง หรือหยุดนิ่งในที่สุด”

ในปี ค.ศ. 1996 Van Drieshce and Bellows ได้ให้คำนิยามของการควบคุมโดยชีววิธีว่า “การนำปรสิต ผู้ล่า (predator) เชื้อโรค (pathogen) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ หรือผู้แข่งขัน (competitor) มาใช้ในการลดปริมาณศัตรูพืช โดยมีผลทำให้ลดน้อยลงหรือเกิดความเสียหายน้อยลง”

2.4.2 การควบคุมโรคแบบชีววิธีโดยการควบคุมจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชด้วยจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุของโรคเรียกว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพ ต้องคำนึงถึงคุณสมบัติหลายอย่าง หรือ อย่างน้อย จะต้องจะต้องสามารถเจริญและสร้างโคโลนีได้อย่างรวดเร็วในบริเวณที่มีบาดแผล และยังสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่ใช้ในการจัดเก็บผลผลิตโดยที่กระบวนการทาง metabolism ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยังสามารถทำงานได้อยู่ นอกจากนี้การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อมาใช้ควบคุมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุของการเกิดโรคใดๆ ยังต้องทราบถึงสภาพทางนิเวศวิทยาของเชื้อก่อโรคนั้นๆ อีกด้วย เช่นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดสามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันอย่างรุนแรงได้สูง ก็จะหาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถแข่งขันในการเจริญได้ยากไปด้วย เช่น เชื้อก่อโรค *Botrytris cinerea* นับว่าเป็นเชื้อเป็นเชื้อแข่งขัน (competitor) ที่อ่อนแอเมื่อเทียบกับเชื้อ *Penicillium* spp. (Bellows, 1999) ที่นอกจากจะมีความทนทานแล้วยังสามารถผลิตสาร secondary metabolite ออกมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆด้วย ดังนั้นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมเชื้อก่อโรคกลุ่มนี้ได้จะต้องทนต่อสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันอย่างรุนแรง เช่นอุณหภูมิสูงมากหรือต่ำมาก สภาวะที่มีความชื้นน้อย หรือสภาวะที่มีอาหารจำกัดได้ มีความเสถียรสูง เป็นกลุ่มจุลินทรีย์หลักที่ยึดพื้นที่ในการเจริญได้ รวมถึงทนต่อ secondary metabolite ที่เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคสามารถผลิตขึ้นมาได้อีกด้วย (Bellows, 1999)

โรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้มักจะเกิดขึ้นจากเชื้อก่อโรคที่แอบแฝงอยู่ในสวนผลไม้ ซึ่งในกรณีนี้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกมาไม่จำเป็นจะต้องสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วเพื่อแข่งขันในการเจริญกับเชื้อก่อโรคเนื่องจากเชื้อก่อโรคเป็นเชื้อเจ้าถิ่นอยู่แล้ว นอกจากนี้การควบคุมไม่ให้เกิดโรคยังทำได้ยาก อย่างไรก็ตามมีรายงานการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมเชื้อก่อโรคแอบแฝงเหล่านี้ได้ เช่น การใช้ *Bacillus* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบมากในผิวพืชที่อยู่บนดิน รวมถึงผิว

ใบ ผิวผลไม้ มาควบคุมเชื้อโรค *Colletotrichum* spp. ในมะม่วง กับ อาโวคาโด การควบคุมโรคโดยใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์นี้สามารถทำได้ตั้งแต่อยู่ในสวน โดยการฉีดพ่นเชื้อ *B. subtilis* ในสวนผลไม้จำนวนสามครั้ง สามารถควบคุมโรค anthracnose ได้เท่ากับการฉีดพ่น copper สามครั้งเช่นกัน นอกจากนี้การฉีดพ่น เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อย่างต่อเนื่อง 4 ครั้งต่อหนึ่งรอบปีสามารถช่วยลดอุบัติการณ์ของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย (Korsten *et al*., 1993)

โรคหลังการเก็บเกี่ยวของจุลินทรีย์ที่เกิดจากการติดเชื้อบริเวณบาดแผล เช่นแผลที่ขั้วผลก็จะต้องเลือกใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อีกแบบหนึ่งที่สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว สามารถแข่งขันการเจริญเพื่อครอบครองพื้นที่ผิวบนบาดแผลของผลผลิต เพื่อที่เชื้อก่อโรคจะไม่สามารถเจริญได้ ในทางการค้า มีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ชื่อ *Agrobacterium radiobacter* เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่พัฒนาสายพันธุ์จนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. tomefaciens* ที่เป็นสาเหตุของโรค crown gall โดยการใช้ *A. radiobacter* เพียงครั้งเดียว ใส่โดยตรงกับแผลหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันกับที่เชื้อโรคจะเจริญและก่อให้เกิดอาการของโรค (Kerr, 1980) ในกรณีที่เกิดการระบาดของเชื้อก่อโรคไปแล้ว ความสามารถในการแข่งขันการเจริญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะมีผลต่อการควบคุมทางชีววิธีมาก ยิ่งเจริญได้เร็วเท่าไหร่ก็จะควบคุมได้ดีเท่านั้น

เชื้อสาเหตุของโรคที่สามารถบุกรุกเข้าทางบาดแผลหลังการเก็บเกี่ยวเช่น เชื้อ *Penicillium expansum* และ *B. cinerea* ที่เป็นสาเหตุของโรคหลังการเก็บเกี่ยว blue mold และ gray mold ในผลแอปเปิลและแพร์ จำเป็นจะต้องได้รับสารอาหารที่สมบูรณ์ เพื่อให้สปอร์สามารถงอกและเจริญต่อไปทำให้เกิดอาการของโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้ ดังนั้นการเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อใช้ควบคุมเชื้อก่อโรคจะต้องเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการแย่งชิงสารอาหารในการเจริญได้ดีกว่าเชื้อก่อโรคจึงจะควบคุมได้ (Janisewicz and Korsten, 2002) นอกจากนี้วิธีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาลดการเน่าเสียหลังการเก็บเกี่ยวให้ได้มีประสิทธิภาพควรจะใช้ก่อนการเก็บเกี่ยวเพื่อให้แน่ใจว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้เป็นเชื้อเจ้าถิ่น สามารถเจริญได้ไปทั่วถึงครอบคลุมผิวของผลไม้ ซึ่งจะให้ผลได้มีและประสิทธิภาพสูงต่อเชื้อก่อโรคที่บุกรุกเข้าทางบาดแผลเช่น *P. italicum* และ *P. digitatum* (Janisewicz and Korsten, 2002) อย่างไรก็ตามการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถควบคุมได้ทั้งหมด อาจต้องใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆด้วย เช่น การใช้สารเคมีเจือจาง ใช้ร่วมกับน้ำร้อน เป็นต้น

แหล่งที่สามารถค้นหาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดโรคกับผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว แหล่งที่ดีที่สุดคือบนผิวของผลไม้ที่คาดว่ามีความเสี่ยงที่จะมีอาการของโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยวสูง แต่กลับพบว่ายังมีความสมบูรณ์อยู่ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่พบบนผิวของผลไม้นั้นๆ จะมีคุณสมบัติในการควบคุมโรคได้ดี การคัดเลือกผลไม้ที่มีสุขภาพดีเพื่อมาแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ควรเลือกจากสวนธรรมชาติที่ไม่เคยผ่านการใช้สารเคมีใดๆแต่ผลไม้ยังมีสุขภาพดี หรือแยกจากแหล่งที่มีอาหารสมบูรณ์เช่น บริเวณบาดแผลของผลไม้ หรือ น้ำผลไม้ หรือในอาหารวุ้นที่ผสมชิ้นส่วน หรือน้ำผลไม้เจือจาง นอกจากนี้แล้วยังสามารถแยกได้จากดินหรือพื้นผิวของพืชเหนือดิน ซึ่งสามารถให้ความหลากหลายได้มากกว่า ครอบคลุม หรือ ควบคุมเชื้อก่อโรคได้หลากหลายกว่าการแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากผิวผลไม้โดยใช้ผลไม้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถแยกได้พบว่ามีมากมายหลากหลายชนิดดังที่แสดงให้เห็นใน ตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 เชื้อก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดต่าง ๆ

Crops	**Pathogens**	**Antagonists**	**References**
Apple	*Penicillium expansum*	*Pseudomonas* sp.	Janisiewicz (1987)
		P. cepacia	Janisiewicz (1988)
		Candida sp.	McLaughlin *et al*. (1990)
		Kloeckera apiculata	McLaughlin *et al*. (1992)
		Acremonium breve	Janisiewicz (1988)
		Candida sake	Vinñas *et al*. (1998)
		Rhodotolula glutinis, Cryptococcus laurentii	Lima *et al*. (1998)
	Botrytris cinerea	*A. breve*	Janisiewicz (1988)
		P. cepacia	Janisiewicz and Roitman (1988)
		Pichia guilliermondii	Wisniewski *et al*. (1988)
		C. sake	Viñas *et al.* (1998)
		C. laurentii	Robert (1990)
		K. apiculata	McLaughlin *et al*. (1992)
		Trichoderma harzianum	Tronsmo and Ystaas (1980)
		T. pseudokoningii	Tronsmo and Raa (1977)
		Pseudomonas syringae	Janisiewicz (1988)
		Candida saitoana	El-Ghaouth *et al*. (2003)
	Botryosphaeria berengeriana	*T. atroviride,*	Kexiang *et al*. (2002)

ตารางที่ 2.2 เชื้อก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

Crops	Pathogens	Antagonists	References
		T. harzainum	
	Rhizopus nigrican	*C. sake*	Viñas *et al*. (1998)
	Mucor piriformis	*P. cepacia*	Janisiewicz and Roitman
	Venturia inaequalis	*Chaetomium globosum*	Heye and Andrews (1983)
	V. inaequalis	*C. globosum*	Boudreau and Andrews (1987)
	Erwinia amylovora	*P. syringae*	Wrather *et al*. (1973)
Apricot	*Monilinia fructicalo*	*Bacillus subtilis*	Pusey and Wilson (1984)
Avocado	*Colletotrichum gloeosporiodes*	*B. subtilis,*	Korsten *et al.* (1989)
	C. gloeosporiodes,	*B. cereus,*	
	Dothiorella aromatica	*B. licheniformis*	
	C. gloeosporiodes,	*B. subtilis,*	Korsten *et al*. (1992)
	D.aromatica,	*B. cereus,*	
	Thyronectria pseudotrichia,	*B. licheniformis*	
	Phomopsis peseae,		
	Lasiodiplodia theobromae,		
	Fusarium solani		
	C. gloeosporiodes	*Cryptococcus* sp.,	Stirling *et al*. (1998)
		Aureobasidium sp.	
Banana	*Colletotrichum musae*	*Pseudomonas sp.*	Coste and Subasinghe (1999)
Blueberry	*Alternaria alternata*	*P. cepacia*	Stretch (1989)
	A. tenuissima	*P. cepacia*	
Cherry	*A. alternata*	*B. subtilis*	Utkhede and Scholberg (1986)
	M. fructicalo	*B. subtilis*	
Citrus	*P. italicum*	*P. cepacia*	Wilson and Chalutz (1989)
	P. italicum	*P. cepacia,*	Wilson and Chalutz (1989)
		Aureobasidium pullulans,	
		P. syringae,	
		Debaryomyces hansenii	
	P. italicum	*P. guilliermondii*	Droby *et al*. (1991)
	P. italicum	*D. hansenii*	Chalutz and Wilson (1990)
	P. digitatum	*B. subtilis*	Singh and Deverall (1984)
	P. digitatum	*Myrothecium roridum,*	Appel *et al*. (1988)

ตารางที่ 2.2 เชื้อก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

Crops	Pathogens	Antagonists	References
		M.verrucaria	
	P. digitatum	*P. syringae,*	Wilson and Chalutz (1989)
		D. hansenii,	
		A. pullulans,	
		P. cepacia	
	P. digitatum	*Trichoderma viride*	De Matos (1983)
	P. digitatum	*B. pumilus*	Haung *et al*. (1992)
	P. digitatum	*P. guilliermondii*	Droby *et al*. (1991)
	Geotrichum candidum	*T. viride*	De Matos (1983)
	G. candidum	*B. subtilis*	Singh and Deverall (1984)
	G. candidum	*D. hansenii*	Chalutz and Wilson (1990)
	G. candidum	*P. guilliermondii*	Droby *et al*. (1991)
	Alternaria citri	*B. subtilis*	Singh and Deverall (1984)
Cranberry	*Apostrasseria lunata*	*A. pullulans*	Stretch (1989)
Grape	*B. cinerea*	*T. harzainum*	Dubos (1984)
	Rhizopus stolonifer	*P. guilliermondii*	Chalutz *et al.* (1988)
	R. stolonifer	*Candida guilliermondii*	McLaughlin *et al*. (1992)
	B. cinerea,	*C. guilliermondii,*	Zhavi *et al*. (2000)
	Aspergillus niger,	*Acremonium cephalosporium*	
	R. stolonifer		
Kiwifruit	*B. cinerea*	*B. subtilis,*	Duncan (1991)
		C. laurentii	
Mango	*Aspergillus flavus,*	*T. viride*	Bhuvaneswari and Rao (2001)
	A. niger,		
	C. gloeosporiodes		
	L. theobromae		
	Macrophomina phaseolina		
	R. stolonifer		
Pear	*B. cinerea*	*C. laurentii*	Zhang *et al*. (2003)
	Monilinia laxa	*T. harzainum*	Guizzardi *et al*. (1995)
	B. cinerea,	*Pantoea agglomerans*	Nunes *et al.*(2001)

ตารางที่ 2.2 เชื้อก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

Crops	Pathogens	Antagonists	References
	P. expansum,		
	R. stolonifer		
Peach	*M. fructicalo*	*P. syringae,*	Zhou *et al*. (1999)
		P. fluorescens	
	R. stolonifer	*Candida* sp.	
Strawberry	*B. cinerea*	*Candida fructus*	El-Neshawy and Shetaia (2003)
		C. glabata	
		C. oleophila	

แม้ว่าจะมีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์นับพันที่สามารถแทรกแซงการก่อโรคของเชื้อโรคพืชได้ในห้องทดลอง green house หรือในสวนที่ทำการควบคุมเพื่อทดสอบ แต่ก็มีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพียงส่วนน้อยที่ถูกพัฒนาเพื่อให้ใช้ได้ในทางการค้า ตัวอย่างเชื้อราปฏิปักษ์ที่ผลิตออกมาในท้องตลาดอาทิเช่น *Gliocladium viren* ที่ผลิตออกขายในชื่อ GlioGard ใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดกับเมล็ดพืช เชื้อรา *T. harzainun* ผลิตออกมาขายในชื่อ F-Stop ใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราจากดิน นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่เป็นที่นิยมได้แก่ *A. radiobactor* K84 ที่ผลิตออกมาขายในชื่อ Galltrol เชื้อ *B. subtilis* ในชื่อ Kodiak ปัจจุบันการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีค่อนข้างมีจำกัด แต่ก็ยังเป็นที่คาดหวังว่าผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะเป็นที่ต้องการของตลาดและเป็นที่ยอมรับในอนาคต ตารางที่ 2.3 แสดงให้เห็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และมีการวางจำหน่ายในท้องตลาดในปัจจุบัน (Agrios, 2005)

ตารางที่ 2.3 Biocontrol product ที่มีการจัดจำหน่ายทางการค้าในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 2003

Products	Source	Target pathogens	Crops	Application
Bacteria				
Galltrol	*Agrobacterium radiobacter* strain 84	*A. tumefaciens* crown gall	Fruit and ornamental	Slurry to seeds, seedlings, drench
Nogall	*A. radiobacter* strain K1026	*A. tumefaciens* crown gall	Fruit, nut, and ornamental nursery stock	Suspension, drench
Companion	*Bacillus subtilis* str. GB03, other	*Pythium, Phytophthora, Fusarium, Rhizoctonia*	Many in greenhouse and nursery	Drench at planting time
HiStick N/T	*B. subtilis* str. MBI600	*Fusarium, Rhizoctonia, Aspergillus*	Legumes	Slurry to seeds
Kodiak	*B. subtilis* GB03	*Rhizoctonia solani, Fusarium, Alternaria, Aspergillus*	Cotton, legumes	Slurry to seeds
Deny	*Burkholderia cepacia,* Wisc.	*Pythium, Rhizoctonia, Fusarium,* several nematode.	Legumes, cotton, grain crops	Seed treatment
Intercept	*B. cepacia*	*R. solani, Fusarium, Pythium*	Maize, vegetables, cotton	Seed treatment, drench
BioJect Spot-Less	*Pseudomonas aureofaciens*	Dollar spot, anthracnose, *Pythium,* pink snow mold	Turf, other	Overhead irrigation
Bio-save 10LP, 110	*P. syringae*	Postharvest *Botrytis, Mucor, Penicillium, Geotrichum*	Pome fruit, citrus, cherries, potatoes	Drench, dip, spray

ตารางที่ 2.3 Biocontrol product ที่มีการจัดจำหน่ายทางการค้าในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 2003 (ต่อ)

Products	Source	Target pathogens	Crops	Application
BlightBan A506	*P. fluorescence* A506	Frost damage, *Erwinia amylovora,* russeting bacteria	Pome and stone fruits, potatoes, tomatoes, strawberries	Spray
Dagger G	*P. fluorescens*	*Rhizoctonia, Pythium*	Field crops, vegetables	Seed treatment
Cedomon	*P. chlororaphis*	Barley, oat leaf spots, *Fusarium*	Grain cereals	Seed treatment
Fungi				
AQ10 Biofungicide	*Ampelomyces quisqualis* M-10	Powdery mildews	Apples, grapes, ornamentals, cucurbits strawberries, tomatoes	Spray
Aspire	*Candida oleophila* I-182	*Botrytis, Penicillium*	Citrus, pome fruit	Drench, drip, spray
Biotox C	Nonpathogenic *F. oxysporum*	*F. oxysporum*	Basil, carnation, tomatoes, cyclamen	Drench
Fusaclean	Nonpathogenic *F. oxysporum*	*F. oxysporum*	Basil, carnation, tomatoes, cyclamen	Drench
Contans WG, Intercept WG	*Coniothyrium minitans*	*Sclerotinia sclerotiorum, S. minor*	Many crops. All soils	Spray
DiTera Biocontrol	*Myrothecium verrucaria*	Parasitic nematodes	Cole crops, grape, ornamentals, turf, trees	Soil application
Polygandron	*Pythium oligsndrum*	*Pythium ultimum*	Sugar beet	
Primastop	*Gliocladium catenulatum*	Soilborne pathogens causing rots and wilts	Ornamentals, vegetables, tree crops	Drench, spray, irrigated water
RootShield, Plant Shield, T-22 Planter box	*Trichoderma harzianum,* Rifai strain - KRL_AG2(T-22)	*Pythium, Rhizoctonia, Fusarium*	Tree, shrub, ornamental, transplants, cabbage, tomato, cucumber	Mixed w/soil, soil drench

ตารางที่ 2.3 Biocontrol product ที่มีการจัดจำหน่ายทางการค้าในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 2003 (ต่อ)

Products	Source	Target pathogens	Crops	Application
F-Stop	*T. harzianum*	*Rhizoctonia, Pythium*	Ornamental and food crops	Seed treatment
SoilGard (GlioGard)	*Gliocladium (Trichoderma) virens GL-21*	*Rhizoctonia solani, Pythium*	Ornamental and food crops, greenhouses, nurseries	Slurry, seed treatment
BINAB T	*T. harzianum/ T. polysporum*	*Wood decay fungi*	Trees	Spray, wound
Promote	*T. harzianum and T. viride*	*Pythium, Rhizoctonia, Fusarium*	Transplants, trees	
Rotstop	*Phlebia gigantea*	*Heterobasidion annosum*	Trees	
Trichodex	*T. harzianum*	*Colletotrichum, Monilia., Plasmopara Rhizop. Sclerotinia*	Various	
Trichopel, Trichoject	*T. harzianum* and *T. viride*	*Armillaria, Botryosphaerim, Fusarium Nectria, Phytophthora, Pythium, Rhizoctonia*	Various	

ที่มา (Agrios, 2005)

2.5 กลไกการทำงานของการควบคุมโดยชีววิธี

กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สามารถเกิดขึ้นได้หลายแบบหากสามารถเข้าใจกลไกการทำงานของจุลินทรีย์เหล่านี้ จะทำให้สามารถ

พัฒนาการคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาประยุกต์ใช้ให้เหมาะกับเชื้อโรคและการควบคุมการแพร่กระจายของโรคมากขึ้น โดยกลไกการยับยั้งการเจริญมีดังต่อไปนี้

2.5.1 กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยการสร้างสารปฏิชีวนะ

แบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้และสารปฏิชีวนะเหล่านี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้อีกด้วย มีการค้นพบมากว่า 30 ปีแล้วว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ นอกจากนี้ยังเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Monilinia fructicola* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวในพืชตระกูลส้ม, ลูกท้อและผลเชอรี่ เมื่อนำสารปฏิชีวนะ ที่สกัดได้จาก *B. subtilis* ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคนี้ไปวิเคราะห์พบว่าเป็นสารที่ชื่อ iturin ซึ่งเป็นสารประเภท cyclic peptide ประกอบไปด้วย กรดแอลฟ่า 7 ตัว และ กรดเบตาอีก 1 ตัว นอกจากนี้ยังพบว่าสาร iturin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้เป็นวงกว้าง ทั้งเชื้อราที่ก่อโรคกับพืชรวมถึงเชื้อราที่ก่อโรคกับมนุษย์อีกด้วย (Gueldner *et al*., 1988) การยับยั้งเชื้อก่อโรค *M. fructicola* โดย *B. subtilis* นี้ เกิดได้ทั้งจากการใช้ cell – free filtrates ของแบคทีเรีย และการใช้เชื้อแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่ในอาหารเหลวฉีดพ่น โดยเชื้อที่ผ่านการ autoclave แล้วนำไปฉีดพ่นจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ (Pusey, 1991) จากข้อเท็จจริงนี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ทั้งการสร้างสารปฏิชีวนะ แ ละวิธีอื่นๆเช่นการแย่งสารอาหารจากเชื้อก่อโรคก็เป็นได้

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas cepacia* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในแอปเปิล ได้แก่เชื้อรา *Botrytris cinerea* และ *Penicillium expansum* โดยสร้างสารปฏิชีวนะที่ชื่อ pyrrolnitrin Barkai-golan (2001) ได้ทำการทดลองกับผลสตรอเบอร์รี พบว่าเมื่อจุ่มผลสตรอเบอร์รีในสาร pyrrolnitrin เพียงอย่างเดียวสามารถชะลอการเกิดโรคจากการเข้าทำลายของ green mold ได้หลายวัน แต่หลังจากนั้นก็ยังเกิดอาการเน่าเสียจากเชื้อราได้อยู่ (Barkai-golan, 2001) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. cepacie* นับได้ว่ามีประสิทธิภาพในการเป็น antagonist ต่อ green mold เพราะเจริญได้รวดเร็วในบริเวณที่มีบาดแผล หากใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์นี้ inoculate ภายใน 12 ชั่วโมงก่อนการเก็บเกี่ยวจะช่วยป้องกันการเจริญของ green mold ได้ โดยการป้องกันเกิดจากการสร้างสาร pyrrolnitrin ของเชื้อแบคทีเรียนั่นเอง ถึงแม้จะทำการทดลองกับเชื้อก่อโรคที่สามารถต้านสาร pyrrolnitrinได้ เช่นเชื้อ *Penicillium digitatum* ก็ยังช่วยลดความเสียหายจากการเสื่อมสภาพของผลไม้ให้ลดน้อยลง ตรงจุดนี้แสดงให้เห็นว่าอาจจะไม่ใช่เฉพาะสารปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียวที่ช่วยต้านเชื้อราก่อโรค แต่ยังมีกลไกอื่นๆที่เกิดขึ้นได้อีกเช่นกัน

มีการทดลองใช้สารปฏิชีวนะบางชนิดที่ใช้กับมนุษย์มายับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว อาทิเช่น chlortetracycline, cycloheximide, fungicidin, griseofulvin, mycostatin และ streptomycin จากการทดลองพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชได้หลายชนิด ได้แก่ *Erwinia carotovora* เชื้อสาเหตุของโรค soft rot , *B. cinerea* เชื้อสาเหตุของโรค grey rot และ *M. fructicola* ที่เป็นสาเหตุของโรค brown rot (Goodman, 1959) แต่อย่างไรก็ตามไม่มีการนำสารปฏิชีวนะเหล่านี้ไปใช้ในทางการเกษตรเนื่องจากมูลค่าสูง และมีความเกี่ยวพันกับสุขภาพของผู้บริโภค อันเนื่องมาจากสารปฏิชีวนะเหล่านี้ที่อาจตกค้างอยู่บนผิวของผลไม้ อาจมีผลให้เกิดการต้านยาปฏิชีวนะในมนุษย์ได้ นอกจากนี้แล้วยังมีความเสี่ยงที่เชื้อโรคจะเกิดการกลายพันธุ์และต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคของมนุษย์ ในทางการค้ามีการผลิตสารปฏิชีวนะมาใช้กำจัดเชื้อก่อโรคในพืชหลังการเก็บเกี่ยวอยู่บ้าง เช่น ผลิตภัณฑ์ของบริษัท BioSave แยกสารปฏิชีวนะชื่อ syringomycin E จากแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* สายพันธุ์ ESC-10 และ ESC-11 ซึ่งมีประสิทธิภาพมากในการควบคุมเชื้อก่อโรคหลายชนิดโดยเฉพาะ เชื้อ *P. digitatum* และ *P. italicum* สาเหตุของโรค green และ blue mold ในพืชตระกูลส้ม แม้ว่าสาร syringomycin E จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง แต่เมื่อทดสอบด้วยการปลูกเชื้อ *P. syringae* ลงบนแผลของผลไม้โดยตรงกลับพบว่าไม่สามารถแยกสาร syringomycin E ออกมาได้เลย (Bull *et al.*, 1997) สาเหตุอาจมาจากปัจจัยอื่นๆร่วมด้วย เช่น ความสามารถในการเจริญ,อัตราการเจริญของเชื้อ รวมถึงความสามารถในการแย่งสารอาหารก็เป็นได้

2.5.2 กลไกการควบคุมแบบแข่งขันแย่งชิงสารอาหารและพื้นที่ในการเจริญ

ความสามารถในการยึดครองพื้นที่ในการเจริญบริเวณบาดแผลของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวรวมถึงความสามารถในการแย่งชิงสารอาหารเป็นอีกกลไกหนึ่งที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรค บริเวณบาดแผลสดของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวอุดมไปด้วยสารอาหาร และมีความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค ดังนั้นการจะคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคนั้น จะต้องเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันอย่างรุนแรงได้ดีกว่า มีอัตราการเจริญที่รวดเร็วกว่า สามารถใช้สารอาหารที่มีอยู่ได้ดีกว่า ใช้สารอาหารได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า หรือแม้แต่เจริญได้ในสภาวะที่เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ มีผลทำให้เชื้อก่อโรคเช่นเชื้อราบางชนิดถูกแย่งอาหารและพื้นที่ในการเจริญ ทำไม่สามารถใช้อาหารได้เติมที่จึงไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ สปอร์ของเชื้อราก่อโรคไม่สามารถงอกได้ทำให้ไม่มีการแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ ของผลไม้

เชื้อยีสต์ในจีนัส *Cryptococcus* ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติเช่น บริเวณผิวใบของแอปเปิล และ ลูกแพร (Roberts, 1991) มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของแอปเปิล ลูกแพร และเชอรี่ เชื้อยีสต์ *Cryptococcus* เจริญได้อย่างรวดเร็ว สามารถมีชีวิตอยู่ในช่วงอุณหภูมิต่ำระหว่าง 0 - 20 องศาเซลเซียสได้ และคุณสมบัติที่สำคัญคือสามารถทนต่อก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่นำมาใช้ในการเก็บรักษาแอปเปิล นอกจากนี้ยังทนทานต่อสารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ benomyl, sodium orthophenylphenate และ rovral แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ก็ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของปริมาณเชื้อยีสต์เท่าๆกันกับอุณหภูมิที่ใช้ในสภาวะการเก็บรักษาผลผลิตด้วย (Roberts, 1991)

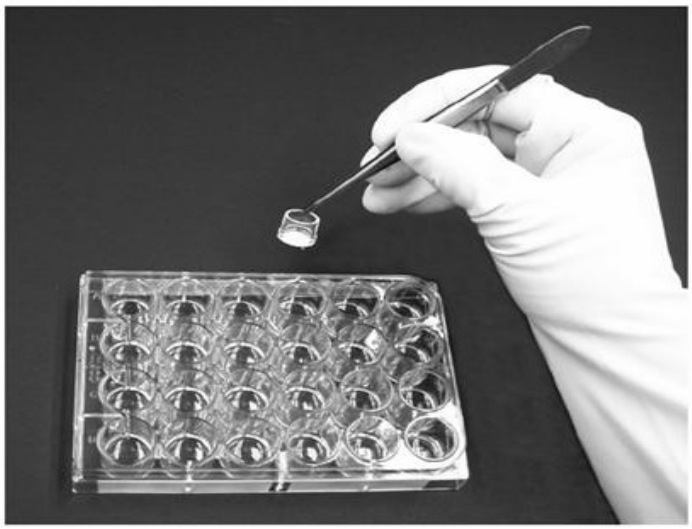
Pichia guilliermondii เป็นเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อเชื้อรา *P. digitatum* ที่เป็นเชื้อราก่อโรคของ grape - fruit เมื่อเพาะเลี้ยงไว้ด้วยกัน โดยพบว่า *P. guilliermondii* สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ *P. digitatum* ยังอยู่ในระยะ initial sate เท่านั้น (Droby *et al*., 1992) นอกจากนี้ *P. guilliermondii* ยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงอุณหภูมิและความชื้นที่กว้างกว่า *P. digitatum* อีกด้วย มีสมมุติฐานสนับสนุนว่ากลไกนี้เป็นกลไกการควบคุมเชื้อก่อโรคโดยการแย่งสารอาหารและพื้นที่ในการเจริญ กล่าวคือ หนึ่งการเพิ่มสารอาหารลงไประหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ และเชื้อก่อโรคไว้ด้วยกัน มีผลทำให้ประสิทธิภาพการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของยีสต์ลดลงเป็นสัดส่วนกับสารอาหารที่เพิ่มเติมลงไป สองคือ อัตราการเจริญของเชื้อก่อโรคลดลงภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารจำกัดเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์กับเชื้อราก่อโรคไว้ด้วยกัน แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอาหารสมบูรณ์ การยับยั้งการเจริญจะไม่เกิดขึ้น และ สามคือเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์มีอัตราการเจริญที่รวดเร็วมากในสภาวะวิกฤตคือภายใน 24 ชั่วโมง สามารถใช้อาหารที่มีอยู่อย่างจำกัดให้หมดไปได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้เชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ *P. guilliermondii* ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคทำให้ลดการเน่าเสียได้ในผลไม้หลากหลายชนิด เช่น ส้ม แอปเปิล องุ่น รวมถึงมะเขือเทศอีกด้วย (Barkai-golan, 2001)

Janisiewicz *et al.* (2000) ได้ทำการทดลองเพื่อทดสอบสมมุติฐานนี้โดยใช้ Tissue culture plate และใช้แท่งพลาสติกทรงกระบอกที่ปลายด้านหนึ่งถูกปิดไว้มาทำการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะการแย่งใช้สารอาหารระหว่างเชื้อปฏิปักษ์และเชื้อก่อโรคโดยควบคุมพื้นที่ในการเจริญ เชื้อปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดลองคือ *Aureobasidium pullulans* เพาะเลี้ยงไว้ด้วยกันกับเชื้อก่อโรค *P. expansum* ในสภาวะที่มีสารอาหารจำกัดในน้ำแอปเปิลในเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เจริญอย่างรวดเร็วและใช้กรดอะมิโนที่จำเป็นจนหมด ทำให้สปอร์ของเชื้อ *P. expansum* ไม่สามารถงอกได้ แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอาหารสมบูรณ์ สปอร์ของเชื้อรา *P. expansum* สามารถงอกได้เทียบเท่ากับสปอร์ของเชื้อรา *P. expansum* ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงไว้กับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการควบคุมเชื้อก่อโรคโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เกิดขึ้นจากการแย่งใช้สารอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัดนั่นเอง (ภาพที่ 2.5)

Filonow *et al.* (1996) ได้ใช้ น้ำตาล glucose ที่ติดฉลากคาร์บอนไอโซโทป 14 มาใช้ทดสอบการแย่งชิงสารอาหารระหว่าง เชื้อยีสต์ *Sporobolomyces roseus* ที่เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *B. cinerea* พบว่าเชื้อยีสต์ *S. roseus* สามารถใช้สารอาหารที่มีคาร์บอนไอโซโทป 14 เป็นส่วนประกอบให้หมดไป เป็นผลให้สปอร์ของเชื้อ *B. cinerea* ที่เป็นสาเหตุของโรค gray mold ในแอปเปิล ไม่สามารถงอกและเจริญต่อไปได้ ต่อมามีการทดสอบการแย่งน้ำตาลที่เป็นสารอาหารหลักโดยเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ *Cryptococcus laurentii* BSR-Y22 และ *S. roseus* FS43 – 238 พบว่าสามารถลดอาการของโรค gray mold ในแอปเปิลที่เกิดจากเชื้อ *B. cinerea* ได้เมื่อทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 1- 7 วัน ปริมาณของเชื้อ *C. laurentii* และ *S. roseus* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว 6 - 9 เท่า ในบาดแผลของผลแอปเปิล

Filonow (1998) ได้ทำการทดสอบการแข่งขันการใช้สารอาหารระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยการติดฉลากน้ำตาลสามชนิดคือ glucose, fructose และ sucrose ด้วยคาร์บอนไอโซโทป 14 ผลการทดลองพบว่าน้ำตาลที่ติดฉลากดังกล่าวจะถูกใช้ให้หมดไปอย่างรวดเร็วโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มากกว่าเชื้อก่อโรค *B. cinerea* ภายใน 48 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยเพาะไว้ด้วยกันกับสปอร์ของ *B. cinerea* ในสภาวะปลอดเชื้อ โดยมีสารละลายน้ำตาลเจือจาง ของ glucose, fructose หรือ sucrose หรือในน้ำแอปเปิลเจือจางเป็นแหล่งสารอาหารเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นถึงกลไกการควบคุมการเจริญแบบแย่งสารอาหารจากเชื้อก่อโรคได้อย่างชัดเจน



ภาพที่ 2.5 การทดสอบโดยใช้ tissue culture plate เพื่อแสดงให้เห็นการแข่งขันเพื่อแย่งสารอาหารในการเจริญเติบโต ระหว่างจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และ จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช (Janisiewicz *et al.*, 2000)

นอกจากการแย่งชิงสารอาหารและพื้นที่ในการเจริญแล้ว ยังมีปัจจัยอย่างอื่นอีกที่เกี่ยวข้องเช่นการสร้างเอนไซม์ การทำงานของเอนไซม์ หรือแม้แต่สารเคมีบางชนิดมีที่ผลต่อการแย่งสารอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงมีผลต่อการเกาะติดกับเส้นใย หรือ มีผลในการช่วยทำให้เส้นใยของเชื้อก่อโรคมีการฉีกขาดอีกด้วย เช่น เชื้อยีสต์ *P. guilliermondii* นอกจากจะแย่งสารอาหารทำให้เจริญได้รวดเร็วกว่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแล้ว ยังสามารถผลิตเอนไซม์ ß - gluconase ที่สามารถย่อยและทำให้เส้นใยของเชื้อราก่อโรค *B. cinerea* เกิดการฉีกขาดได้อีกด้วย (Wisniewski *et al.,* 1991) เชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* ปริมาณ 10^{10} cfu ต่อ มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Rhizopus stolonifer* ชะลอการเสื่อมสภาพหรืออาการเน่าของลูกพีชได้ และยังสามารถผลิตสาร ammonia มาช่วยในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *R. stolonifer* อีกทางหนึ่งด้วย (Wisniewski *et al.,* 1989)

Filonow (1999, 2001) ได้แสดงให้เห็นว่าสารระเหยที่ผลแอปเปิลสร้างขึ้นคือ butyl acetate กระตุ้นให้เกิดการเกาะติดของเชื้อก่อโรค *B. cinerea* กับ membrane filter ได้ดีขึ้นและเพิ่มอัตราการเกิดการเสื่อมสภาพของแอปเปิลให้สูงขึ้นด้วย แต่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *C. laurentii* และ *S. roseus* สามารถใช้สาร butyl acetate ที่แอปเปิลสร้างขึ้นนี้เป็นแหล่งอาหารทำให้ลดการกระตุ้นการเสื่อมสภาพของผลแอปเปิลได้ในห้องปฏิบัติการ

Jijakli and Lepoivee (1998) และ Gravese *et al*. (1998) ได้ทำการทดลองโดยใช้ยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ K ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค gray mold จากเชื้อ *B. cinerea* ในแอปเปิล พบว่าเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ exo-ß-1,3-gluconase ถึงสามเท่า มีผลทำให้รอยฟกช้ำลดลงได้กว่าครึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อยีสต์ปฏิปักษ์เพียงอย่างเดียว สนับสนุนสมมุติฐานว่าเอนไซม์ exo-ß-1,3-gluconase มีความเกี่ยวพันกับการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของเชื้อยีสต์ *P. anomala*

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Aureobasidium pullulans* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ exo- ß-1,3-gluconase และ chitinase ที่มีความเกี่ยวข้องต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้เช่นกัน และสามารถตรวจพบได้ทั้งในห้องปฏิบัติการและบนแผลที่ผิวของแอปเปิล อาจเป็นไปได้ว่ากระบวนการทำงานของเอนไซม์เกิดขึ้นในช่วงแรกเพื่อกระตุ้นให้เกิดการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค และกระตุ้นให้ผลไม้ปล่อยเอนไซม์ดังกล่าวออกมาด้วย มีการทดสอบเพื่อยืนยันการทำงานของเอนไซม์โดยการกดยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อเอนไซม์ ß – 1,3 – gluconase ในเชื้อก่อโรค พบว่าเชื้อ *A. pullulans* ก็ยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่ชื่อว่า aureobasidiins ออกมาทดแทนได้อีกด้วย (Castoria *et al.,* 2001; Takesako *et al.,* 1991)

Erwinia herbicola สายพันธุ์ B66 และ B90 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ต่อ *B. cinerea* และ *P. expansum* และเป็นchemotaxis ต่อ conidia และ germ tube ของเชื้อราก่อโรคทั้งสองชนิด โดยจะไปยับยั้งการงอกของ conidia หรือสปอร์ของรา และทำให้เกิดการฉีกขาดของ germ tube ในน้ำแอปเปิลเจือจาง แต่หากเป็นในน้ำแอปเปิลที่ไม่ได้เจือจางซึ่งมีสารอาหารสมบูรณ์ ปฏิกิริยานี้จะไม่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นเพราะปฏิกิริยาการควบคุมโดยชีววิธีนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการแย่งสารอาหารของ *E. herbicola* (Bryk *et al*., 1998; Sobiczewski and Bryk, 1996)

Candida oleophila เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อ *P. digitatum* เชื้อสาเหตุของโรค green mold ในผลไม้ตระกูลส้ม โดยเชื้อ *C. oleophila* มีคุณสมบัติพิเศษคือนอกจากจะเจริญได้อย่างรวดเร็วบนบาดแผลขนาดใหญ่ของผลไม้แล้ว ยังสามารถตอบสนองต่อแผลเล็กๆอย่างเช่นการแตกของต่อมน้ำมันบนผิวของผลไม้ตระกูลส้มอีกด้วย โดยพบว่าจะเจริญอย่างรวดเร็วเมื่อใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงไปภายใน 1- 2 วัน ที่อุณหภูมิ 21 และ 30 องศาเซลเซียส แต่จะไม่พบโคโลนีของเชื้อ *C. oleophila* ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส และหากใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์นี้ลงไปหลังจากเกิดการแตกของต่อมน้ำมันจากผิวส้มเป็นเวลานาน 7 วันจะให้ผลในการควบคุมเชื้อ *P.*

digitatum ได้ดีกว่าเนื่องจากน้ำมันที่ปล่อยออกมาจากต่อมน้ำมันเป็นพิษต่อเชื้อ *C. oleophila* แต่ไม่มีผลต่อเชื้อก่อโรค *P. digitatum* (Brown *et al*., 2000)

Pantoea agglomerans CPA-2 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์กับ *P. digitatum* และ *P. italicum* ที่ก่อโรคในผลไม้ตระกูลส้ม โดยเชื้อ *P. agglomerans* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคทั้งสองสายพันธุ์ได้โดยไม่สร้างสารปฏิชีวนะหรือ กระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์ หรือ ใช้เอนไซม์เชื้อ *P. agglomerans* จะทำการควบคุมเชื้อก่อโรคต่อเมื่อเจริญอยู่ด้วยกัน จากการทดลองโดยใช้ tissue culture plate ที่มีแท่งพลาสติกทรงกระบอกปลายปิดด้วยเมมเบรน เพื่อทดสอบการแข่งขันการใช้สารอาหารโดยไม่เกี่ยวกับพื้นที่พบว่า เชื้อ *P. agglomerans* ทำให้การงอกของสปอร์ของเชื้อก่อโรคลดลง แต่อย่างไรก็ตามอาจจะมีปฏิกิริยาอื่นเกิดขึ้นร่วมกันกับการแย่งสารอาหารด้วย แต่ยังไม่สามารถระบุได้ (Poppe *et al*., 2003)

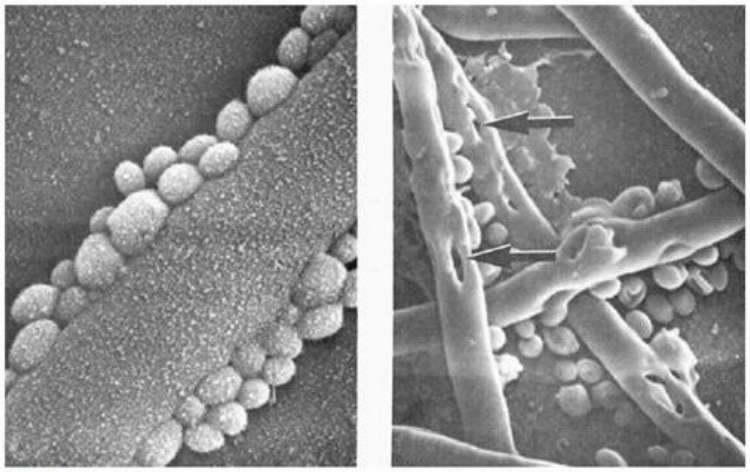
เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* จะผลิตสารที่ชื่อว่า siderophore ซึ่งจะช่วยในการจับยึดธาตุเหล็กในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่าเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ที่เป็นสาเหตุโรค Take-all ของ ข้าวสาลี ทำให้เชื้อรานี้ไม่สามารถทำลายรากของข้าวสาลี ช่วยให้ข้าวสาลีเจริญเป็นปกติ และให้ผลผลิตดีขึ้นด้วย (Hamdan *et al*., 1991)

จากหลายๆรายงานจะเห็นได้ว่าการแข่งขันการแย่งสารอาหารและพื้นที่ในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์กับเชื้อก่อโรคสามารถบ่งชี้ได้ว่าเกิดขึ้นได้จริงแต่ยากที่จะแยกออกจากกลไกอื่นอย่างแน่ชัด เช่น การกระตุ้นด้วยเอนไซม์ บางกลไกจะเกิดขึ้นได้เมื่อเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้รับสารอาหารที่มากพอ หรือเกิดขึ้นในช่วงแรกของการเจริญเท่านั้น

2.5.3 การเป็นปรสิตโดยตรงของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และจุลินทรีย์ก่อโรค

มีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลายชนิดที่เข้าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการเป็นปรสิตกับเชื้อก่อโรคโดยตรงโดยสามารถเห็นได้ชัดเจนจากภาพถ่ายของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เช่น เชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ *P. guilliermondii* กับเชื้อราก่อโรค *B. cinerea* และ *P. expansum* จากภาพที่ 2.6 จะเห็นความสามารถของเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ที่เกาะติดอย่างหนาแน่นกับเส้นใยของเชื้อราก่อโรค มีผลทำให้เส้นใยของเชื้อราก่อโรค เกิดเป็นหลุม หรือ โพรง สร้างความเสียหายแก่เส้นใยของเชื้อราก่อโรค ในทางตรงกันข้ามหากเป็นเชื้อยีสต์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะสามารถเกาะติดได้แบบหลวมๆ และไม่สามารถก่อให้เกิดความเสียหายแก่เส้นใยของเชื้อราก่อโรคได้แต่อย่างใด (Wisniewski *et al*.,

1991; 1988) และเมื่อได้ทดลองแยกเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ดังกล่าวมาตรวจสอบ พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ gluconase ได้ในอัตราที่สูงกว่าเชื้อยีสต์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และเอนไซม์ gluconase เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการย่อยสลายของผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรคในบริเวณที่มีเชื้อยีสต์ *P. guilliermondii* ไปเกาะติดอยู่ ซึ่งจากการศึกษาพบว่านอกจากการที่ยีสต์ปฏิปักษ์สามารถแย่งสารอาหารได้ดีกว่าเชื้อราก่อโรคแล้วยังสามารถให้เกาะติดกับเส้นใยของเชื้อราได้ดีและปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยผนังเซลล์ทำให้เส้นใยเสียหายในที่สุด(Wisniewski *et al*., 1988; 1991) แสดงให้เห็นการทำงานร่วมกันของกลไกการเข้าควบคุมทั้งสองทางที่เสริมประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราก่อโรคให้ดียิ่งขึ้น

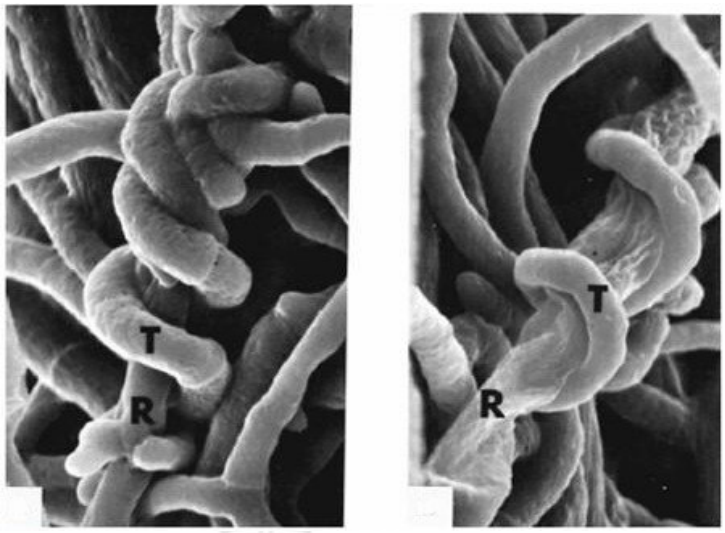


ภาพที่ 2.6 การเกาะติดของเชื้อยีสต์ *P. guilliermondii* บนเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *B. cinerea* (ซ้าย) และ โพรงบนเส้นใยของเชื้อราก่อโรคที่เกิดจากเชื้อยีสต์ (ขวา) (Agrios, 2005)

เชื้อราเช่น *Pythium nunn* ไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชแต่เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และเป็นปรสิตที่แท้จริงต่อเชื้อราก่อโรค *Phytophthora* sp. โดยเส้นใยของเชื้อรา *P. nunn* สามารถเจริญเจาะเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* sp. ได้ ทำให้เส้นใยของ *Phytophthora* sp. แห้งตายในที่สุด (ภาพที่ 2.7)

ภาพที่ 2.7 เส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์ *Pythium nunn* แทงทะลุเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *Phytophthora* sp. (Agrios, 2005)

เชื้อราปฏิปักษ์อีกชนิดหนึ่งที่ได้ชื่อว่ามีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อราก่อโรคคือเชื้อรา *Trichoderma* โดยเชื้อรา *T. harzianum* เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์กับเชื้อราก่อโรค *Sclerotium rolfsii* และ *Rhizoctonia solani* โดยมีการสร้างเอนไซม์ chitinases และ glucanases ออกมาเมื่อเพาะเลี้ยงไว้ด้วยกันกับเชื้อราก่อโรค (Elad *et al*., 1982) โดยเส้นใยเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* จะเจริญโดยพันเป็นเกลียวรอบเชื้อราก่อโรค ก่อนที่จะปล่อย chitinolytic enzyme ออกมาเพื่อทำลายเส้นใยของเชื้อราก่อโรคดังกล่าว (ภาพที่ 2.8) นอกจากนี้ในทางการค้ายังมีการใช้เชื้อรา *T. harzianum* มายับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวในองุ่น ที่เกิดจาก *B. cinerea* ได้อีกด้วย เชื้อรา *T. harzianum*สามารถลดการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยของเชื้อก่อโรคได้โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อรา *B. cinerea* หลายๆชนิดเช่น cutin esterase, pectin methyl esterase, exopolygalacturonase, endopolygalacturonase และ pectate lyase เมื่อเพาะเลี้ยงไว้ด้วยกันทั้งในอาหารเหลวและ บนผิวของใบถั่ว (Kapat *et al*., 1998)



ภาพที่ 2.8 (T) เส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* พันเป็นเกลียวรอบเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* (R) หลังจากเพาะเลี้ยงไว้ด้วยกันเป็นเวลา 2 วัน (ซ้าย) หลังจากผ่านไป 6 วันเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* เกิดอาการเหี่ยวอย่างเห็นได้ชัดในขณะที่เส้นใยของ *T. harzianum* ยังมีลักษณะปกติ (ขวา) (ที่มา : Agrios, 2005)

นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Fusarium proliferatum* ที่เป็นปรสิตกับเชื้อก่อโรค *Plasmopara viticola* ที่ก่อให้เกิดโรค downy mildew ในองุ่นทั้งใบและผล เส้นใยของเชื้อ *F. proliferatum* จะพันเป็นเกลียวรอบเส้นใย และ sporangiopore ของเชื้อ *P. viticola* และทำให้เส้นใยเกิดอาการแห้งเหี่ยว เช่นเดียวกันกับเชื้อ *T. harzianum* อีกด้วย (Falk *et al*., 1996)

2.5.4 การกระตุ้นให้พืชสามารถต้านทานเชื้อก่อโรคได้เอง

นอกจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคได้เองแล้วยังสามารถกระตุ้นให้พืชที่ถูกคุกคามจากเชื้อก่อโรคสามารถป้องกันตนเองได้ด้วย เช่น กลไกหนึ่งของเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ *P. guilliermondii* เมื่อใช้ควบคุมราก่อโรคในผลไม้ตระกูลส้มสามารถกระตุ้นให้ผลไม้สร้าง ethylene และเพิ่มระดับของเอนไซม์ phynylalanine ammonia lyase เพื่อป้องกันตนเองให้มากขึ้นได้ด้วย (Droby *et al*., 1992)

เชื้อยีสต์ *Candida famata* (isolate F35) เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ต่อเชื้อรา *P. digitatum* สาเหตุของโรค green mold ในส้ม สามารถลดความเสียหายจากการก่อโรคของเชื้อราได้ถึงร้อยละ 90 (Arras, 1996) โดยเชื้อยีสต์จะเกาะติดกับเส้นใยของเชื้อราและสร้างความเสียหาย

ให้แก่เชื้อราและยังสามารถกระตุ้นให้ผลไม้สร้างสาร phytoalexins, scoparone และ scopoletin ในบริเวณบาดแผลของผลไม้ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์เป็น fungitoxin สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราได้อีกด้วย (Arras,1996)

2.6 การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* โดยชีววิธี

ทัศวรรณ และ คณะ (2547) ทำการแยกจุลินทรีย์จากผิวพืชและสามารถแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (ไม่ระบุชนิด) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ 25 ไอโซเลท และมีจำนวน 10 ไอโซเลทที่มีผลต่อการงอกของสปอร์ของรา จุลินทรีย์จำนวน 7 ไอโซเลททำให้ germ tube ของรามีลักษณะบวมพองผิดรูปร่าง และอีก 3 ไอโซเลททำให้การงอกของสปอร์ลดลง จากร้อยละ 82.2 เป็นร้อยละ 63.2 จากการทดสอบกับผลเงาะพบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคลงได้ร้อยละ 52 - 78 เมื่อปลูกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนแผลของเงาะก่อนปลูกเชื้อรา

อุดม ฟ้ารุ่งสาง และ คณะ (2548) ได้แยก phylloplane yeasts ที่ปรากฏอยู่ตามธรรมชาติมายับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* สาเหตุของโรคเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะ โดยทำการศึกษาผลของเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ต่อการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* พบว่ามีเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์จำนวน 37 ไอโซเลท จากเชื้อยีสต์ทั้งหมด 721 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 44 - 16/2 เป็นเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดโดยสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราให้ลดลงเหลือร้อยละ 34.97 จากร้อยละ 79.39

สมศิริ แสงโชติ และ สุมิตรา แสงวนิชย์ (2548) ได้ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* สาเหตุของโรคขั้วหวีเน่าบนกล้วยหอมทอง โดยใช้เชื้อยีสต์ 11 ชนิด ทดสอบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าการใส่เชื้อยีสต์ก่อนเชื้อรา 24 ชั่วโมง สามารถควบคุมโรคหวีเน่าได้ดีกว่าการใส่เชื้อยีสต์พร้อมหรือหลังเชื้อรา 24 ชั่วโมง โดยเชื้อยีสต์ *Endomycosis fibuligera* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุม และลดความรุนแรงของโรคได้ถึงร้อยละ 82.7

Mortuza and Ilag (1999) ได้คัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลทมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* โดยใช้เทคนิค dual culture และศึกษาการเป็นปรสิตของเชื้อรา *T. hazainum* และ *T. viride* ต่อ เชื้อรา *L. theobromae* โดยดูจากเกลียวของเชื้อรา *Trichoderma* spp.ที่ขดเป็นเกลียวรอบเส้นใยของ *L. theobromae* ทำให้เกิดความผิดปกติของรูปร่างของเส้นใยเช่นเกิดการบวมโป่งพอง หรือ หดสั้นลง หรือ กลมมน เกิด granulation ของ cytoplasm และ เกิดการ disintegration ของผนังเซลล์ของเชื้อรา *L. theobromae* อีกด้วย จากการทดลองกับผลกล้วยพบว่าเชื้อรา *T. viride* สามารถลดการเน่าเสียได้ร้อยละ 29.07 ถึง 65.06 การใส่เชื้อ *T. viride* กับผลกล้วยเป็นเวลา 14 ชั่วโมงก่อนเชื้อรา *L. theobromae* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากกว่าการใส่ไปพร้อมกันหรือ หลังจากใส่เชื้อรา *L. theobromae* ไปแล้ว 14 ชั่วโมง

Sivakumar *et al.* (2000) แยกเชื้อราปฏิปักษ์ *T. hazainum* (TrH 40) ได้จากผิวพืชในสวนเงาะ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคสามชนิด รวมถึงเชื้อรา *L. theobromae* ที่เป็นสาเหตุของโรค stem end rot ในเงาะ สามารถลดการเจริญของเส้นใยได้ถึงร้อยละ 68 โดยการยับยั้งเกิดขึ้นทั้งในแบบเป็นปรสิตแท้และการสร้างสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อก่อโรคโดยการทำลายผนังเซลล์ คือ glucanase และ chitinase ผลการทดสอบสามารถรักษาคุณภาพ และสีของผลไม้ได้ดี

Swain and Ray (2006) แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* จาก cowdung โดย *B. subtilis* ที่แยกได้นี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* (*B. theobromae*) ที่แยกได้จากแผลเน่าเสียภายหลังการเก็บเกี่ยวของ yam tuber ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยกันแบบ dual culture ได้อย่างสมบูรณ์ เชื้อราก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ กระบวนการยับยั้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์คาดว่า เป็นการแย่งสารอาหารและพื้นที่ในการเจริญ โดย *B. subtilis* สามารถเจริญได้รวดเร็วกว่ามากและเจริญเต็มพื้นที่ของจานอาหารเลี้ยงเชื้อจนทำให้เชื้อรา *L. theobromae* ไม่สามารถเจริญได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สายพันธุ์เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* และการเก็บรักษาสายพันธุ์

เชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์ CMUL, LP1, LP2 และ LG2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผลลำไยที่เน่าเสีย แยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์เก็บใน culture collection ของสถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) และเชื้อรา *L. theobromae* type strain 1120 จากกรมวิชาการเกษตร สำหรับการเพาะเลี้ยงจะใช้อาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยนำเชื้อรามาวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อและบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 - 2 วัน จากนั้นจึงใช้คอร์ก บอร์เรอร์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตรตัดบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา ได้เป็นชิ้นวุ้นที่มีส่วนของเส้นใยของเชื้อราเพื่อใช้ปลูกเชื้อต่อไป สำหรับการเก็บรักษาสายพันธุ์ทำได้โดยเพาะเชื้อราบนอาหาร PDA slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 สายพันธุ์แบคทีเรียและการเก็บรักษาสายพันธุ์

3.2.1 stock culture ของแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่าจากคลังจุลินทรีย์ที่รวบรวมไว้ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง (ผศ.ดร.เอกชัย ชูเกียรติโรจน์) จำนวนทั้งหมด 170 ไอโซเลท

3.2.2 stock culture ของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรากพืชสมุนไพร จำนวนทั้งหมด 111 ไอโซเลท (ผศ.ดร.เอกชัย ชูเกียรติโรจน์)

3.2.3 culture ของแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวของผลลำไยโดยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นำมาแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่งโดยนำมาลากบนอาหาร nutrient agar (NA) แยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยว โดยแยกได้ทั้งหมดจำนวน 3 ไอโซเลท

3.2.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมดเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA และเก็บรักษาโดยแยกเชื้อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว เลือกหนึ่งโคโลนีของแต่ละ ไอโซเลท ไปเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 rpm ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นแบ่ง culture broth ที่ได้ ใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อทิ้ง ปั่นล้างเซลล์อีกครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จะได้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียอัดแน่นอยู่ในหลอด microcentrifuge tube เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของอาหารปกติลงไป 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติมกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 80 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นสารป้องกันความเย็น (cryoprotective agents) ใช้ไปเปตผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 70 องศาเซลเซียส

3.3 การทดสอบ pathogenicity ของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL กับผลลำไย (ปรับปรุงจากวิธีของ ประพันธ์ โอสถาพันธุ์ และคณะ, 2544)

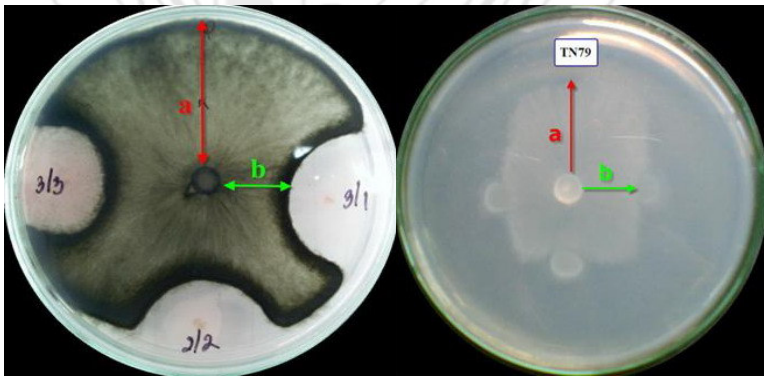
นำผลลำไยสุกมาคัดเอาผลที่มีขนาดสม่ำเสมอกัน ไม่มีบาดแผลหรือรอยโรคใดๆบนผิวเปลือก มาทำการตัดขั้วผล และฆ่าเชื้อที่ผิวเปลือกโดยการแช่ใน clorox bleach ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาผึ่งลมให้แห้ง วางในถาดพลาสติกที่มีความชื้น แล้วนำไปฆ่าเชื้อบริเวณผิวอีกครั้งด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งผลลำไยออกเป็นสองชุด โดยชุดที่หนึ่งทำการปลูกเชื้อราโรคพืช โดยใช้ชิ้นวุ้นที่มีส่วนของเส้นใยของเชื้อรามาแตะไว้ที่บริเวณขั้วของผลลำไยเทียบกับชุดที่สองซึ่งเป็นชุดควบคุมจะใช้ชิ้นวุ้นที่ปราศจากเชื้อมาแตะไว้ที่บริเวณขั้วของผลลำไย แบ่งลำไยทั้งสองชุดบรรจุในขวดที่ปราศจากเชื้อขวดละ 4 ผล ใช้สำลีชุบน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อใส่ลงไปเพื่อให้มีความชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเกิดการเน่าเสียของผลลำไยที่เกิดขึ้นจากเชื้อราเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปราศจากเชื้อราก่อโรค

3.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยแบคทีเรีย

ทำการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค *L. theobromae* ด้วยเทคนิค dual culture test โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรียจาก stock culture ที่ต้องการทดสอบไว้ด้วยกันบนอาหาร PDA นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราอายุประมาณ 2 วัน (ข้อ 3.1) วางไว้กลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบไว้ด้วยกันโดยปลูกเชื้อไว้ 3 จุดรอบเชื้อรา ให้มีระยะห่างประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วจึงนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* บันทึกผลการเจริญของเส้นใยของเชื้อราด้านที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (control) จากจุดเริ่มต้นเป็นมิลลิเมตร (a) เทียบกับการเจริญของเส้นใยของเชื้อราด้านที่ทำการปลูกเชื้อทดสอบ (b) แล้วคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งโดยใช้สูตรตามภาพที่ 3.1 และ 3.2 (Sivakumar *et al*., 2000)

$$\% \text{ inhibition} = \{(a) - (b) / (a)\} \times 100$$

ภาพที่ 3.1 การคำนวณหาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา



ภาพที่ 3.2 การวัดระยะการเจริญของเส้นใยของเชื้อราจากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราที่ 48 ชั่วโมง (ซ้าย) และ 18 – 19 ชั่วโมง (ขวา)

จากนั้นจึงคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ได้มาทำการทดสอบต่อไป

3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมกับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของแบคทีเรีย

3.5.1 การหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดมาจาก ข้อ 3.4 โดยเลือกมา 3 ไอโซเลท ที่มีผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดของแต่ละแหล่งที่มา ปรับให้มีปริมาณเซลล์ตั้งต้นให้อยู่ในช่วง 10^3 ถึง 10^4 CFU ต่อ มิลลิลิตร (OD600 ≈ 0.6) โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ culture broth ที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน flask ขนาด 150 มิลลิลิตรที่มี NB อยู่ 25 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30, 37, 45, 55, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ culture broth ที่ได้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออก โดยใช้ความเร็วรอบ 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบการยับยั้งเชื้อรา ตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยการบันทึกรัศมีการเจริญของเชื้อราในแต่ละไอโซเลทของแบคทีเรีย (18 - 19 ชั่วโมง) ดังภาพที่ 3.2 ทำการทดลอง ไอโซเลท ละ 3 ซ้ำ

3.5.2 การหาสภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

นำ culture broth จากข้อ 3.5.1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask ขนาด 150 มิลลิลิตร ที่มี NB อยู่ 25 มิลลิลิตรโดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหาร NB ให้มีค่าเท่ากับ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง culture broth ที่ได้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด Microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออก โดยใช้ความเร็วรอบ 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบการยับยั้งเชื้อรา ตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยการบันทึกรัศมีการเจริญของเชื้อราในแต่ละไอโซเลท ของแบคทีเรีย (18 - 19 ชั่วโมง) ทำการทดลอง ไอโซเลท ละ 3 ซ้ำ

3.6 การสกัดสารยับยั้งเชื้อราจากแบคทีเรีย โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง

เตรียมอาหาร NA เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความบางให้มากที่สุดแต่ยังสามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียได้ ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกมา จากข้อ 3.5 จำนวน 3 ไอโซเลท บนอาหาร NA ที่เตรียมไว้โดยเลี้ยงเชื้อให้เต็มพื้นที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ นำจานอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไว้มาขูดเชื้อแบคทีเรียออก จากนั้นใช้มีดซอยชิ้นวุ้นที่เหลืออยู่ให้ละเอียด แบ่งใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ให้มีปริมาณเท่า ๆ กัน เติม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7 (0.144% Na_2HPO_4 : 0.024 % KH_2PO_4) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปใน centrifuge tube เขย่าโดยใช้เครื่องเวอร์เท็กซ์ มิกเซอร์ ให้สารในอาหารวุ้นออกมาละลายในบัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกวุ้นออกจากสารสกัดโดยใช้ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำ supernatant หรือ สารสกัดที่ได้ไปกรองเอาเชื้อแบคทีเรียที่เหลือออก โดยใช้แผ่นกรองที่ปราศจากเชื้อขนาด 0.45 ไมโครเมตร (1 - 2 มิลลิลิตร) เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.7 การทดสอบความเสถียรของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย

3.7.1 ค่า pH

เตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปรับให้มี ค่า pH ให้เท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 นำไปสกัดสารละลายจากอาหารวุ้นแข็งตามวิธีในข้อ 3.6 นำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยเทคนิค agar spot methodโดยใช้ปริมาณสารสกัดในการหยดแต่ละครั้งเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ทำการทดลอง ไอโซเลทละ 3 ซ้ำ

3.7.2 อุณหภูมิ

แบ่งสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย 150 ไมโครลิตรใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้พาราฟิล์มปิดเพื่อไม่ให้เกิดการระเหยออกไป นำไปให้ความร้อนด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 37, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยเทคนิค agar spot method ใช้ปริมาณสารสกัดในการหยดแต่ละครั้งเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ทำการทดลอง ไอโซเลท ละ 3 ซ้ำ

3.7.3 Autoclave (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที)

แบ่งสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย 150 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรใช้พาราฟิล์มพันบริเวณฝาปิดเพื่อไม่ให้เกิดการระเหยออกไป นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยเทคนิค agar spot method ตามวิธีในข้อ 3.4.2 ใช้ปริมาณสารสกัดในการหยดแต่ละครั้งเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ทำการทดลอง ไอโซเลท ละ 3 ซ้ำ

3.7.4 เอนไซม์ proteinase K

การทดสอบนี้ใช้เอนไซม์ proteinase K มาทำการทดสอบ (Qi-qin *et al*., 2006) โดยเตรียม stock เอนไซม์ proteinase K ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย 95 ไมโครลิตรใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ proteinase K จาก stock ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร (ให้ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยเทคนิค agar spot method ตามวิธีในข้อ 3.4.2 ใช้ปริมาณสารสกัดในการหยดแต่ละครั้งเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ทำการทดลอง ไอโซเลท ละ 3 ซ้ำ

3.7.5 รังสีอัลตราไวโอเลต

การทดสอบนี้ใช้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (Yu *et al*., 2001) โดยให้สารสกัดได้รับแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 30 นาที และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยให้มีระยะห่างจากต้นกำเนิดแสงประมาณ 15 - 20 เซนติเมตร จากนั้นนำสารสกัดไปทดสอบกับเชื้อรา โดยเทคนิค agar spot method ตามวิธีในข้อ 3.4.2 ใช้ปริมาณสารสกัดในการหยดแต่ละครั้งเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ทำการทดลองไอโซเลทละ 3 ซ้ำ

3.8 การทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา โดยใช้สารสกัดจากแบคทีเรีย

เตรียม spore suspension ของเชื้อรา *L. theobromae* โดยตัดชิ้นส่วนของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนกล้วยน้ำว้าที่ปราศจากเชื้อเป็นเวลา 1 เดือนจนเชื้อราเจริญขึ้นปกคลุมเป็นสีดำสนิททั่วทั้งผล ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 x 100 มิลลิเมตร ประมาณ 1 กรัม จำนวน

ทั้งหมด 3 หลอด จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เวอร์เท็กซ์ มิกเซอร์เพื่อให้สปอร์หลุดออกมาในน้ำกลั่น จากนั้นใช้ ไปเปตดูดเอา spore suspension ทั้งหมดจากหลอดที่หนึ่งใส่ลงในหลอดที่สองเขย่าอีกครั้งให้สปอร์ราหลุดออก และดูดเอา spore suspension ออกจากหลอดที่สองมาใส่ในหลอดที่สามอีกครั้ง เขย่าให้เข้ากันเป็นครั้งสุดท้าย การเขย่าน้ำกลั่นกับเชื้อราถึงสามครั้งก็เพื่อให้มีปริมาณสปอร์เพียงพอที่จะใช้ทำการทดลอง ทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ปรับความเข้มข้นของ spore suspension ให้ได้ปริมาณของสปอร์เท่ากับ10^5 สปอร์ ต่อ มิลลิลิตร จากนั้นใช้ไมโครไปเปต ดูด spore suspension ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (≈$5x10^3$ spores)นำมาผสมกับ สารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บนสไลด์หลุมที่ปราศจากเชื้อซึ่งบรรจุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมใส่สำลีชุบน้ำกลั่นเพื่อให้ความชื้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมง โดยมีชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตรแทนสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย ประเมินผลการงอกของสปอร์ราภายใต้กล้องจุลทรรศน์อย่างน้อย 100 สปอร์ต่อ สารสกัด เทียบกับการงอกของสปอร์ของราจากชุดควบคุม

3.9 การตรวจสอบชนิดของสารสกัดจากแบคทีเรียโดยใช้เครื่อง Gas Chromatography – Mass spectrometry (GC-MS)

นำตัวอย่างสารสกัดจากแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ทั้ง 3ไอโซเลท ส่งไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ด้วยเครื่องมือ GC (Agilant Technologies 6890N Network GC system) ซึ่งต่ออยู่กับเครื่อง MS (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector) เครื่อง GC ใช้คาปิลลารีคอลัมน์ HP-5MS ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร และความหนาของฟิล์มเท่ากับ 0.25 ไมโครเมตร (Agilent 19091S-433) อุณหภูมิเริ่มต้นที่ช่องปล่อยสาร 250 องศาเซลเซียส ในระบบสปลิทเลสโหมด อุณหภูมิเริ่มต้นของโอเว่นเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และค่อยๆเพิ่มขึ้นเป็น 230 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพาที่อัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อนาที ความดัน 8.81 psi จำแนกองค์ประกอบของสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับสเปกตราในฐานข้อมูล National Institute of Standards and Technology (NIST) Library Rev.D.03.00

3.10 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ คุณสมบัติทางชีวเคมี

3.10.1 การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

ตรวจสอบรูปร่าง ลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว บนอาหาร NA ตรวจสอบการติดสีแกรม ขนาด รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ โดยการย้อมสีแกรม ตรวจสอบการมี หรือไม่มีเอนโดสปอร์ และตำแหน่งของเอนโดสปอร์ โดยการย้อมสีสปอร์ ตรวจสอบการมีหรือไม่มีแคปซูลโดยวิธี wet Indian-ink film ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้หัวน้ำมัน (oil immersion lens) (ภาคผนวก ก)

3.10.2 การตรวจสอบทางชีวเคมี

1. การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์คาตาเลส

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากข้อ 3.4 ในอาหารวุ้นเอียง NA จนเชื้ออายุได้ 24 ชั่วโมง หยด 3% H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดและแห้ง เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบ มา 2 loopfull แตะลงในหยดของ H_2O_2 ถ้าเกิดฟองก๊าซขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้ แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก

2. การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่

ศึกษาการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียโดยวิธี hanging drop technique ส่องดูการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยแป้ง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ในอาหารเหลวทดสอบการย่อยแป้ง บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 - 72 ชั่วโมง หยดสารละลายไอโอดีน 2 - 3 หยดลงในอาหารเหลว อ่านผลทันที ผลบวกคือไม่มีการเปลี่ยนสี ผลลบคือ มีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงิน

4. การทดสอบ methyl red และ voges-proskauer (MR-VP)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ลงในอาหาร MR-VP medium บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วันทดสอบโดยหยดเมทิลเรด โซลูชั่น ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก ส่วนการทดสอบอะซีโตอินหยด 10% แอลฟาแนปทอลลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 20% ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ ถ้ามีสีแดงเชอรี่เกิดขึ้นแสดงผลเป็นบวก

5. การทดสอบการใช้ซิเตรท

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ลงบนอาหาร simmons citrate agar บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารผลบวกคืออาหารเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

6. การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ไปเลี้ยงในอาหาร Motility indole lysine medium (MIL) โดยใช้เข็มเขี่ยแตะและแทงลงไปในอาหารวุ้นตรงๆ บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยดน้ำยาโคแวคลงไป 2 - 3 หยด ตั้งทิ้งไว้ ถ้าเกิดเป็นชั้นสีแดงแสดงว่าแบคทีเรียชนิดนั้นสามารถสร้างอินโดลได้ แต่ถ้าเป็นสีเหลืองแสดงว่าเป็นผลลบ

7. การทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 7.5%

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ไปเลี้ยงในอาหารNA ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 7.5% บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ผลบวกคือ เชื้อแบคทีเรียนั้นสามารถเจริญได้

8. การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ไปเลี้ยงในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตที่ต้องการทดสอบอยู่ ซึ่งในการทดลองนี้ทดสอบกับคาร์โบไฮเดรต 4 ชนิดคือ น้ำตาลกลูโคส แมนนิทอล, ไซโลสและอาราบิโนส บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ ผลบวกคืออาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และ ตรวจดูการเกิดก๊าซจากหลอดดักก๊าซด้วย

3.10.3 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย โดยใช้ API50 CHB/E kits (bioMérieux) (ภาคผนวก ก)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 – 20 ชั่วโมง เก็บเชื้อไปทดสอบโดยใช้สำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อกวาดเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหน้าอาหาร นำไปเขย่าในสารละลายโซเดียมคลอดไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารแขวนลอยเชื้อลงใน API 50 CHB/E medium โดยปรับให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ 2 แมคฟาร์แลน จากนั้นจึงนำไปหยอดลงใน API50 CH strip บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อ่านผลการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ 2 ครั้งที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แปรผลการทดสอบเทียบกับตารางของ API50 CHB/E kits

3.10.4 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย โดยใช้ 16S rRNA sequence analysis

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 3 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง นำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 14000 rpm 3 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติม STE buffer 450 ไมโครลิตร (100 มิลลิโมล โซเดียมคลอไรด์, 1 มิลลิโมล อีดีทีเอ pH 8, 10 มิลลิโมล ทริส pH7.5) และ เอนไซม์ lysozyme (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์ proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร และ 20% เอสดีเอส 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มอีกครั้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลลาร์ ปริมาตร 70 ไมโครลิตร และ คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 630 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อให้โปรตีนที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ตกตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 14,000 rpm 10 นาที ถ่ายเอาสารละลายที่มี จีโนมิคดีเอ็นเอไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วจึงเติมไอโซโพรพานอล ไปในปริมาณหนึ่งเท่าตัวผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 rpm 5 นาที จากนั้นจึงเทน้ำด้านบนทิ้งไป จะได้ ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่อัดแน่นที่ก้นหลอด เติมเอทานอลที่แช่ไว้ที่อุณหภูมิเยือกแข็ง (-20 องศาเซลเซียส) ลงไป 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 14000 rpm 5 นาที เทเอทานอลทิ้งไป ปล่อยให้แห้ง ประมาณ 10 - 15 นาที จนเห็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็นสีขาว เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 50 ไมโครลิตร เก็บรักษา DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

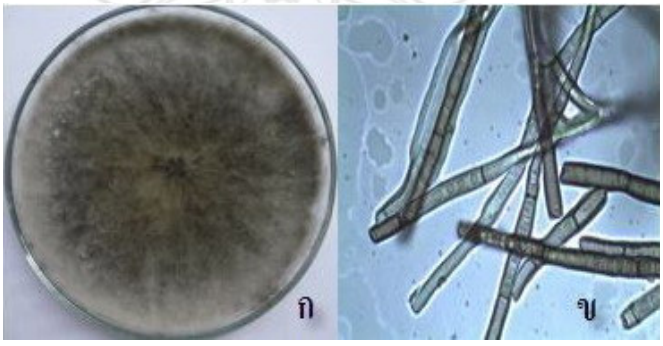
การทำ 16S rRNA sequencing ได้รับความอนุเคราะห์จาก อ.สยาม ภพลือชัย และมหาวิทยาลัยนิวคาสเซิล สำหรับ primer ที่ใช้ในการ amplified 16S rRNA genes คือ pA (8F) (5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′) และ pH′(1542R) (5′-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3′) (Edwards *et al*., 1989; Pantos *et al*., 2003) เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับ16S rRNA genes sequences ในฐานข้อมูลของ GenBank และ EMBL โดยใช้เครื่องมือ Basic Local Alignment Search Tool หรือ BLAST search และวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียจากการทำ phylogenetic dendrogram

บทที่ 4

การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae*

4.1 ผลการทดสอบ pathogenicity ของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL กับผลลำไย

เชื้อรา *L. theobromae* เจริญได้ดีบนอาหาร PDA สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 48 ชั่วโมงเมื่อปล่อยทิ้งไว้เส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเทาดำแต่ยังไม่สร้างสปอร์ (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) แต่การทดสอบ pathogenicity จะทดสอบกับผลลำไยโดยตรง การทดสอบ pathogenicity เป็นการทำเพื่อพิสูจน์ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *L. theobromae* โดยทำตามทฤษฎีของ Koch's postulates เมื่อปลูกเชื้อบริสุทธิ์ลงบนผลลำไยที่อ่อนแอต่อโรค จะต้องเกิดลักษณะอาการของโรคเหมือนกับโรคที่นำมาศึกษา โดยไม่มีเชื้ออื่นมาปนเปื้อน พบว่าลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* จะเกิดอาการของโรคหลังจากบ่มได้ 2 - 3 วัน มีการเปลี่ยนแปลงของสีผิวเปลือกนอกเป็นสีน้ำตาลคล้ำ มีลักษณะฉ่ำน้ำมีส่วนของเส้นใยของเชื้อราฟูเจริญคลุมบริเวณที่ปลูกเชื้อ และมีการเน่าเสียเกิดขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.3) ผลจากการทดสอบ pathogenicity แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์นี้สามารถก่อให้เกิดโรคได้กับผลไม้จริง และเหมาะที่จะทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญโดยใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อไป



ภาพที่ 4.1 (ก) ลักษณะของเส้นใยของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหาร PDA
(ข) เส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL (100X)

ภาพที่ 4.2 mature conidia ของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ซึ่งไม่สร้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (100X)

ภาพที่ 4.3 ผลลำไยที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา (ซ้าย) ผลลำไยที่ปลูกเชื้อรา *L. theobromae* CMUL (ขวา)

4.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ด้วยแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่า ดินบริเวณรากพืชสมุนไพรและ แบคทีเรียจากผิวของผลลำไย

4.2.1 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในการทดสอบขั้นต้น

จากการทดสอบแบคทีเรียขั้นต้นจาก stock culture ทั้งสามแหล่งด้วยเทคนิค dual culture test รวมทั้งหมด 284 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียจากถั่วเน่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้จำนวน 39 ไอโซเลทจาก 170 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 22.94 โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ TN 11 สามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 67 ซึ่งเป็นค่าสูงที่สุดของการยับยั้งจากทั้งสามแหล่ง แบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้จำนวน 2 ไอโซเลท จาก 111 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 1.8 โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ RS5 สามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 50 และ แบคทีเรียที่แยกได้จากผิวของผลลำไยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 2 ไอโซเลท จากทั้งหมด 3 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 66.67 โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ CMU 2 สามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 50 เท่ากันกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยสรุปจากแบคทีเรียทั้งสามแหล่งในการทดสอบขั้นต้น

แหล่งที่มา	จำนวนเชื้อทั้งหมด (ไอโซเลท)	จำนวนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ไอโซเลท)	การยับยั้งการเจริญ [a] (%)
ถั่วเน่า	170	39 (22.94%)	25.0 - 67.5
ดินบริเวณรากพืชสมุนไพร	111	2 (1.8%)	45.0 - 50.0
ผิวเปลือกของลำไย	3	2 (66.67%)	45.9 - 50.0

หมายเหตุ : [a] ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เป็นร้อยละจากค่าต่ำสุดถึงสูงสุด

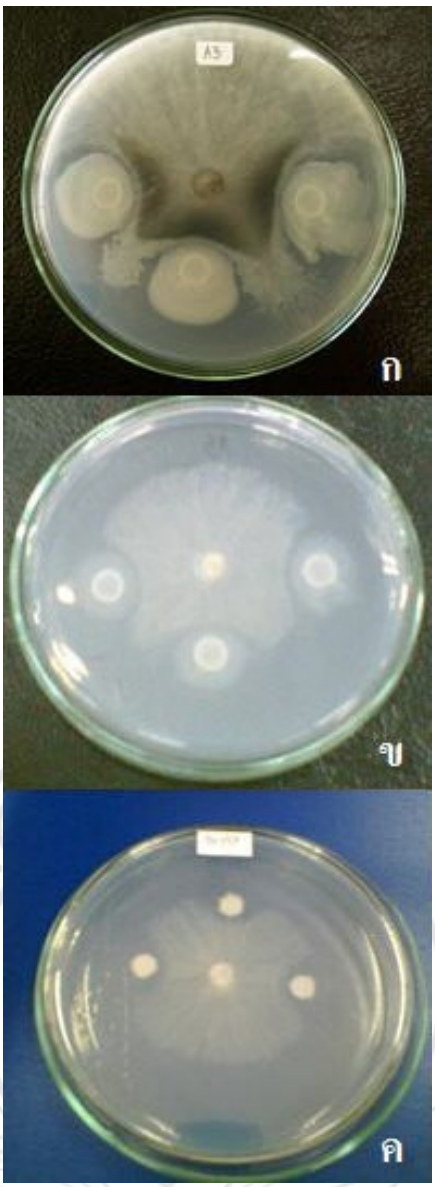
4.2.2 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant)

จากผลการทดสอบแบคทีเรียขั้นต้นในข้อ 4.2.1 นำแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ทั้งหมด 43 ไอโซเลท จากทั้งสามแหล่งมาทดสอบอีกครั้งด้วยเทคนิค dual culture test แต่เปลี่ยนจากการใช้เชื้อแตะเป็นจุดโดยตรงในอาหารมาใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นจึงเลือกโคโลนีเดี่ยวไปเพาะเลี้ยงอีกครั้งในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออก โดยใช้ความเร็วรอบ 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบการยับยั้งเชื้อรา โดยวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราตรงกลางจานอาหาร แล้วหยดน้ำเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 5 ไมโครลิตร สามจุดรอบเชื้อรา ให้มีระยะห่างเท่ากับ 2 เซนติเมตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 19 - 20 ชั่วโมง บันทึกผลการเจริญของเส้นใยของเชื้อราด้านที่ไม่ได้ทำการหยดน้ำเลี้ยงเชื้อ (control) จากจุดเริ่มต้นเป็นมิลลิเมตร เทียบกับการเจริญของเส้นใยของเชื้อราด้านที่ทำการหยดน้ำเลี้ยงเชื้อ แล้วคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งโดยใช้สูตร (Sivakumar *et al*., 2000)

อย่างไรก็ตามพบว่าแม้ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนแล้วก็ยังมีเซลล์ของแบคทีเรียหลงเหลืออยู่ จากการทดลองพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้จำนวน 36 ไอโซเลท โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ TN 79 สามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 52.00 โดยแบคทีเรียไอโซเลท TN 5, 9 และ 59 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ แบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชสมุนไพรยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ทั้ง 2 ไอโซเลท โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ RS5 สามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 52.40 ซึ่งเป็นค่าการยับยั้งที่สูงที่สุดเมื่อเปลี่ยนมาใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ และแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวของผลลำไยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ทั้ง 2 ไอโซเลทแต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลง โดยเฉพาะ CMU 3 ประสิทธิภาพลดลงมากโดยเหลือเพียงร้อยละ 1.30 เท่านั้น (ตารางที่ 4.2)

นอกจากนี้การทดสอบโดยใช้ น้ำเลี้ยงเชื้อหยดลงบนอาหาร PDA โดยตรงยังพบว่ามีเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียหลงเหลืออยู่ (ภาพที่ 4.6 ก) จึงได้ทดสอบซ้ำด้วยเทคนิค paper disc diffusion โดยแบ่งเป็นสามการทดลอง ได้แก่ หนึ่งใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออก สองใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที และ สามใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ผ่าน

การกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตรเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่เหลืออยู่ให้หมด ผลการทดลองพบว่า paper disc diffusion ที่ใช้ น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปั่นแยกเซลล์ออกยังคงพบการเจริญของเซลล์แบคทีเรียอยู่ และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ได้ แต่ในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการต้มให้เดือดจะพบการเจริญของเซลล์บ้างเล็กน้อย และพบว่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเกิดขึ้นได้เฉพาะใน disc ที่ยังคงมีเชื้อแบคทีเรียหลงเหลืออยู่เท่านั้น ในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียโดยการกรอง พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ได้โดยสิ้นเชิง ดังนั้นในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราจึงไม่สามารถใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้ (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *L. theobromae* CMUL เมื่อทดสอบกับ (ก) เซลล์แบคทีเรีย (ข) เมื่อใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ และ (ค) เมื่อใช้น้ำเลี้ยงเชื้อหยดลงใน paper disc

ตารางที่ 4.2 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL เป็นร้อยละโดยใช้เซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่แยกได้จาก ถั่วเน่า ดิน และผิวของผลลำไยโดยวิธี dual culture test จากแบคทีเรียที่คัดเลือกมาแล้วจากการทดสอบขั้นต้น 43 ไอโซเลท

สายพันธุ์แบคทีเรีย [a]	ร้อยละของการยับยั้ง (น้ำเลี้ยงเชื้อ) [c]	ร้อยละของการยับยั้ง (เซลล์) [b]
RS5	**52.4** *	50.0
TN112	52.0	40.0
TN79	**52.0** *	60.0
TN117	51.2	37.5
TN142	49.4	27.5
TN133	47.6	60.0
TN3	46.2	45.0
TN2	45.7	32.5
TN119	45.3	30.0
TN129	44.0	25.7
TN188	44.0	37.5
TN107	43.9	25.0
TN6	42.7	37.5
CMU2	**42.4** *	50.0
TN5	41.0	50.0
TN9	41.0	27.5
TN92	41.0	45.0
TN59	40.0	37.5
TN153	38.7	27.5
TN147	38.3	27.5
TN130	37.2	37.1
TN168	36.1	50.0
RS3	35.7	45.0
TN68	34.7	50.0
TN125	34.6	55.0
TN121	33.3	30.0
TN16	33.3	45.0

ตารางที่ 4.2 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL เป็นร้อยละโดยใช้เซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่แยกได้จาก ถั่วเน่า ดิน และผิวของผลลำไยโดยวิธี dual culture test จากแบคทีเรียที่คัดเลือกมาแล้วจากการทดสอบขั้นต้น 43 ไอโซเลท (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย [a]	ร้อยละของการยับยั้ง (น้ำเลี้ยงเชื้อ) [c]	ร้อยละของการยับยั้ง (เซลล์) [b]
TN101	30.8	30.0
TN28	29.6	50.0
TN134	28.0	48.6
TN8	28.0	32.5
TN11	26.9	67.5
TN114	26.7	27.5
TN149	21.3	48.6
TN126	20.3	37.5
TN141	20.3	30.0
TN148	17.9	45.0
TN144	17.3	30.0
TN122	7.2	42.9
CMU3	1.3	45.9
TN103	0.0	37.5
TN25	0.0	30.0
TN90	0.0	37.5

หมายเหตุ [a] TN หมายถึง เชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่า
RS หมายถึง เชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชสมุนไพร
CMU หมายถึง เชื้อแบคทีเรียจากผิวของผลลำไย

[b] ร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราโดยใช้เซลล์แบคทีเรีย

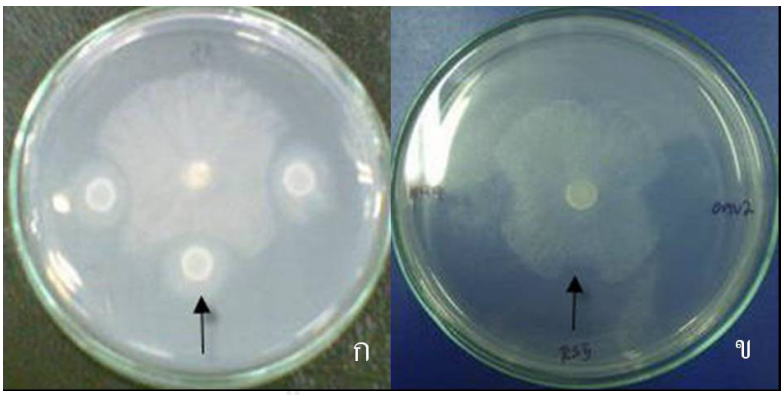
[c] ร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ

[*] ค่าการยับยั้งสูงสุดของแบคทีเรียตัวแทนจากถั่วเน่า ดินจากรากพืช และ ผิวของผลลำไย

4.2.3 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* โดยใช้สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียที่สกัดจากอาหารวุ้นแข็ง

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจะเห็นได้ว่าการยับยั้งเกิดจากเซลล์แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง จึงคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราที่สูงสุดที่มาจากแต่ละแหล่งคือ TN79 จากถั่วเน่า RS5 จากดินและ CMU2 จากผิวของผลลำไย (ตาราง 4.2) เนื่องจากมีความแข็งแรงและสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ แม้ว่าจะมีจำนวนเซลล์น้อยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและสกัดสารยับยั้งเชื้อราออกมา (ภาพที่ 4.5) เมื่อนำสารสกัดหยาบมาทดสอบพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ และไม่พบว่ามีเซลล์ของแบคทีเรียเจริญอยู่แต่อย่างใด บริเวณจุดที่หยดสารสกัดจากแบคทีเรียลงไปจะเห็นได้ว่าเส้นใยของเชื้อรามีการเว้าอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าเป็นสารที่แบคทีเรียปล่อยออกมาในอาหารวุ้นแข็ง หรือกล่าวได้ว่าแบคทีเรียสามารถสร้าง extra - cellular metabolite มายับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ได้จริง สารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ CMU2 สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 37.68 รองลงมาคือ TN79 ยับยั้งได้ร้อยละ 34.78 และ RS5 สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 31.82 (ภาพที่ 4.6 ข) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อบ่มต่อไปเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เส้นใยของเชื้อราก็จะมีการเจริญทับอาหารวุ้นบริเวณที่หยดสารสกัดไปได้ โดยที่บริเวณที่เส้นใยของเชื้อราสัมผัสกับสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียเส้นใยจะมีการเปลี่ยนสีเป็นสีดำเห็นได้อย่างชัดเจน

ภาพที่ 4.5 (ก) การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อการสกัดสารยับยั้งเชื้อราบนอาหารวุ้นแข็งNA (ข) อาหารวุ้นซอยจนละเอียดก่อนนำไปสกัดสารยับยั้งเชื้อรา



ภาพที่ 4.6 (ก) การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อพบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (ข) การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยสารสกัดจากอาหารวุ้นแข็งไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

4.3 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์ อื่นๆ

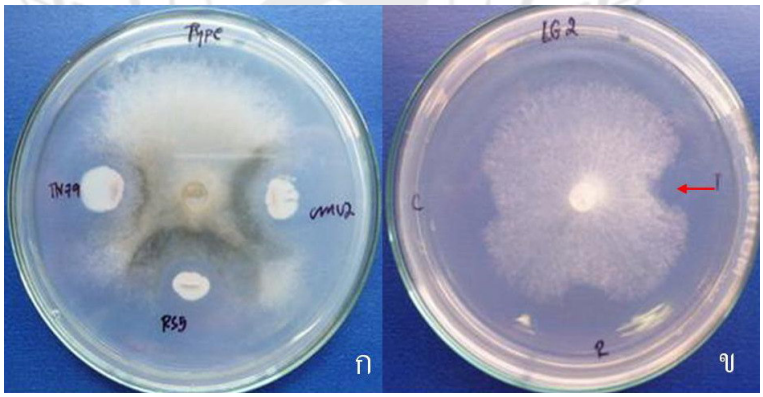
จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียTN79, RS5 และ CMU2 กับเชื้อรา *L. theobromae* CMUL แล้วยังได้ทำการทดสอบกับเชื้อรา *L. theobromae* อีกสี่สายพันธุ์คือ LP1, LP2, LG2 ซึ่งได้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์เชื้อราดังกล่าวจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ type strain 1120 จากกรมวิชาการเกษตร โดยเชื้อราสายพันธุ์ LP1, LP2, LG2 มีการเจริญบนอาหาร PDA ไม่แตกต่างกันกล่าวคือเส้นใยมีลักษณะฟูขาวเมื่อ มีการเจริญออกเป็นรัศมีสม่ำเสมอเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราวางไว้ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 - 3 วันเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ 1120 มีการเจริญจากจุดกึ่งกลางออกไปเป็นรัศมีไม่ค่อยสม่ำเสมอ และ เจริญช้ากว่าอีกสามสายพันธุ์ ใช้เวลามากกว่า 48 ชั่วโมงจึงจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 - 2 วันเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีดำเช่นกันและมีการสร้างรงควัตถุสีแดงมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ จากการทดสอบโดยใช้เซลล์ของแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งหมดได้ มีร้อยละของการยับยั้งอยู่ระหว่าง 40.00 - 52.17 (ตารางที่ 4.3) ส่วนการใช้สารสกัดจากแบคทีเรียพบว่ายังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสี่สายพันธุ์ได้ แต่ประสิทธิภาพของการยับยั้งลดลงเหลืออยู่ระหว่างร้อยละ 17.39 - 34.78 (ตารางที่ 4.4) โดยใช้เวลาทดสอบที่ 18 - 19 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.7)

ตารางที่ 4.3 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสายพันธ์ต่างๆ ด้วยเซลล์ของแบคทีเรีย

สายพันธุ์แบคทีเรีย	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์ต่างๆ (%)			
	LP1	**LP2**	**LG2**	**1120**
TN79	40.00 ± 0.00	50.00 ± 0.00	47.83 ± 0.00	52.17 ± 0.00
RS5	45.00 ± 0.00	52.17 ± 0.00	47.83 ± 0.00	52.17 ± 0.00
CMU2	40.00 ± 1.00	39.13 ± 1.00	47.83 ±1.73	52.17 ± 0.00

ตารางที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสายพันธ์ต่างๆ ด้วยสารสกัดจากแบคทีเรีย

สายพันธุ์แบคทีเรีย	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์ต่างๆ (%)			
	LP1	**LP2**	**LG2**	**1120**
TN79	17.39 ± 0.50	26.09 ± 0.00	34.78 ± 0.00	12.50 ± 0.00
RS5	26.09 ± 0.00	26.09 ± 0.00	26.09 ± 0.00	12.50 ± 0.00
CMU2	26.09 ± 0.00	30.43 ± 1.00	17.39 ± 0.00	33.33 ± 0.00

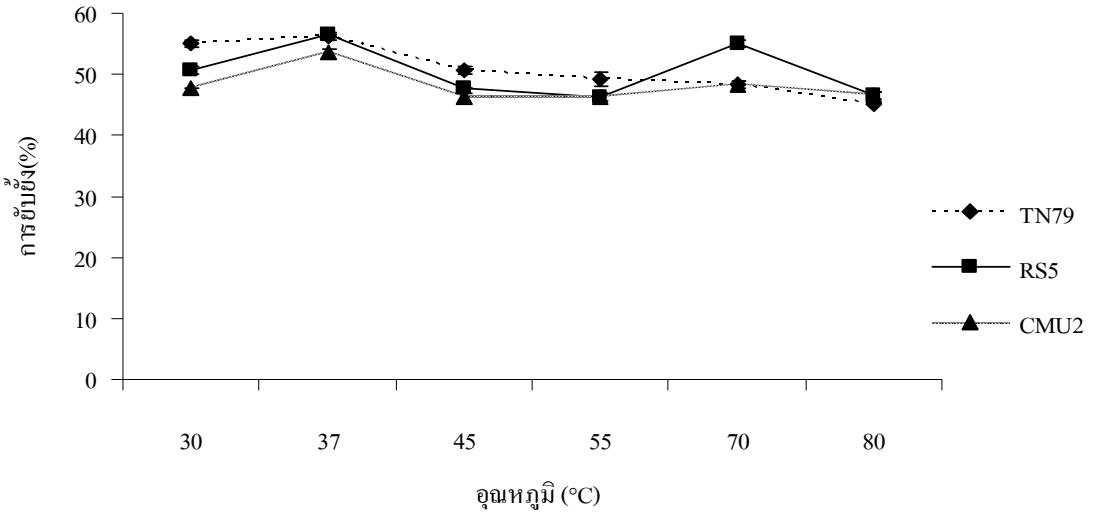


ภาพที่ 4.7 (ก) การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 1120 ด้วยเซลล์ของแบคทีเรียยับยั้งได้สูงสุดที่ร้อยละ 52.17 (ข) การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา LG2 ด้วยสารสกัดจากแบคทีเรีย TN79 ยับยั้งได้สูงสุดที่ร้อยละ 34.78

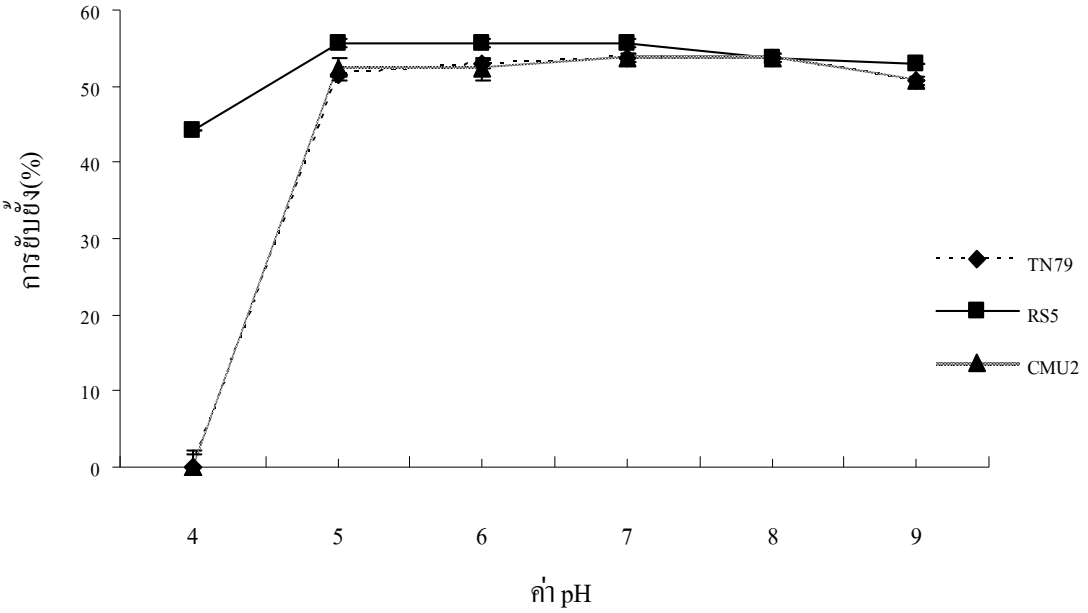
4.4 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารของแบคทีเรียเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างต่างๆกัน

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสูงที่สุดของแต่ละแหล่งที่มา คือ TN79, RS5 และ CMU2 มาทดสอบต่อ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NB ปริมาตร25 มิลลิลิตรบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเชื้อแบคทีเรียจากดินรากพืชสมุนไพร RS5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ มากที่สุดคือ ร้อยละ 56.52 เชื้อแบคทีเรียยังสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างและยังคงประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ในทุกอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ (ภาพที่ 4.8)

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงที่สภาวะความเป็นกรดด่างต่างๆกันในอาหาร NB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 4 - 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 5 - 9 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ไม่ต่างกันมากนัก แต่จะดีที่สุดในช่วง pH 7 - 8 แต่อย่างไรก็ตาม ที่ค่า pH 4 มีเฉพาะแบคทีเรียไอโซเลท RS5 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.8 ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นร้อยละเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวช่วงอุณหภูมิที่ต่างกัน



ภาพที่ 4.9 ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นร้อยละ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่มีค่าความเป็นกรดด่างในช่วง pH 4 - 9

4.5 อภิปรายผล

เชื้อราก่อโรค *L. theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl (synonym *Botryodiplodia theobromae*) จัดอยู่ใน Class Coelomycetes เป็นเชื้อราที่โดยมากพบในเขตร้อนและกึ่งร้อน มักจะแยกเชื้อรานี้ได้จากผลไม้ที่มีอาการเน่าเสียและแผลที่เปลือกของต้นไม้ (wood staining) (Richard *et al*., 2004) เชื้อรานี้สามารถก่อให้เกิดโรคในพืชได้มากกว่า 500 ชนิด (Cedeno *et al*., 1996) โดยเฉพาะโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของพืชเศรษฐกิจในเขตร้อนและเขตอบอุ่นอาทิ กล้วย (Mortuza and Ilag, 1999; Anthony *et al*., 2004) มะม่วงและส้ม (Singh, 2000) เงาะ (ทัศนวรรณ ศรีวะอุไร, 2547) ทุเรียน (สมศิริ แสงโชติ, 2539) ลิ้นจี่ และ ลำไย (ประพันธ์ โอสถาพันธุ์ และคณะ, 2544) เป็นต้น การเข้าทำลายผลไม้ของราเป็นแบบแอบแฝงที่เกิดขึ้นได้ทุกขณะ เมื่อมีสภาวะเหมาะสมเชื้อราจะงอกและเข้าทำลาย อาจเกิดในระยะขนส่งหรือเก็บรักษา ทำให้เกิดความเสียหายกับผลผลิต 10 - 15 % และอาจจะเพิ่มมากถึง 30 % ในระหว่างการขนส่ง การเก็บรักษา และ ระหว่างการจัดจำหน่าย

การเข้าทำลายของเชื้อราภายหลังการเก็บเกี่ยวจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดแผลที่ผิวของผลไม้ เช่นโรค Stem-end rots เชื้อรา *L. theobromae* จะเข้าทำลายทางบาดแผลผ่านบริเวณรอยตัดจากการเก็บเกี่ยว ซึ่งในการทดลองกับผลลำไยจะมีรอยแผลบริเวณขั้วผล เมื่อทิ้งไว้ให้ผลสุกมากขึ้นอาการของโรคจะพัฒนาอย่างรวดเร็วโดยเชื้อราที่ปลูกไว้จะลุกลามจากขั้วผลไปจนถึงภายในผล (สุมิตรา, 2547) ที่อุณหภูมิห้อง (25 - 30 องศาเซลเซียส) ความชื้นสูงในระบบปิด ภายใน 3 - 7 จะวันพบอาการเน่าที่ชัดเจนและสร้างความเสียหายให้กับผลผลิตเป็นอันมาก

การควบคุมเชื้อราก่อโรคนิยมกระทำทั้งในแง่ทางฟิสิกส์ เช่นการควบคุมโดยใช้อุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิสูง การฉายรังสี และการใช้สารเคมี เช่นสารฆ่าเชื้อรา แต่ในที่นี้การควบคุมโดยชีววิธี หรือ Biological control ก็เป็นทางเลือกหนึ่งที่ทำได้โดยไม่ทำลายสิ่งแวดล้อมและไม่เป็นอันตรายต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค โดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้จากธรรมชาติมาใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรค มีรายงานการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *L. theobromae* เช่น การใช้เชื้อรา *Trichoderma viride* ในการควบคุมโรคขั้วหวีเน่าในกล้วย สามารถลดการเกิดโรคได้ถึงร้อยละ 29.07 - 65.06 เมื่อปลูกเชื้อรา *T. viride* บนผลกล้วยก่อนเชื้อรา *L. theobromae* เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Mortuza and Ilag, 1999) การใช้เชื้อแบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CM1 และ CM3 ที่แยกได้จาก Cowdung สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกันแบบ dual culture บนอาหาร PDA (Swain and Ray, 2006) และในประเทศไทย มีรายงานการใช้เชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* มาควบคุมโรคขั้วหวีเน่า พบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ถึงร้อยละ 82.7 เมื่อใส่เชื้อยีสต์ก่อนปลูกราเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สมศิริ แสงโชติ และ สุมิตรา แสงวนิชย์, 2548) จะเห็นได้ว่ามีความพยายามในการคัดเลือกจุลินทรีย์จากธรรมชาติมาทดสอบการยับยั้งการเจริญและควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* มาบ้างแล้ว แต่เป็นการใช้สปอร์ของเชื้อรา เซลล์ของแบคทีเรียและยีสต์โดยตรง ส่วนการใช้สารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรานั้น มีรายงานว่าการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ หรือ สารกรอง (culture filtrate) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ เชื้อยีสต์ที่มีชีวิตเท่านั้นที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (สุมิตรา, 2547) ในรายงานของ Swain and Ray (2006) กล่าวว่า *Bacillus subtilis* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. theobromae* ได้อย่างสมบูรณ์ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นเพราะสามารถเจริญได้รวดเร็วกว่าเชื้อรา มีความสามารถในการแย่งอาหารและพื้นที่ในการเจริญได้มากกว่าการปล่อย secondary metabolite มายับยั้งการเจริญของเชื้อรา ดังนั้นการใช้เชื้อ *B. subtilis* มาควบคุมเชื้อรา *L. theobromae* จึงใช้วิธีจุ่มผลไม้ลงใน cell suspension (Singh, 2000) แทนการใช้สารสกัดจากแบคทีเรีย ในการทดลองนี้เราจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติที่ สามารถสร้าง extra cellular metabolite และสกัด

ออกมาเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ เพื่อให้เป็นแนวทางในการควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติ จากสามแหล่ง คือ ถั่วเน่า ดินบริเวณรากพืชสมุนไพร และ ผิวของผลลำไย โดยการคัดเลือกจุลินทรีย์จากถั่วเน่า เนื่องจากถั่วเน่าเป็นอาหารที่เกิดจากการหมักถั่วเหลือง โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในตระกูล *Bacillus* ซึ่งนับได้ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สูงและครอบคลุมเป็นวงกว้าง ส่วนการแยกคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวของผลลำไยนั้นก็เป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่า จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชสุขภาพดีเป็นจุลินทรีย์เจ้าถิ่น สามารถเจริญได้บนผิวของผลไม้อยู่แล้ว จึงคาดว่าจุลินทรีย์นั้น ๆ จะมีคุณสมบัติการควบคุมโรคได้ดี และสำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินบริเวณรากพืชสมุนไพรนั้น เนื่องจากเป็นแหล่งรวมของแร่ธาตุ และสารอาหารที่จากการย่อยสลายของชิ้นส่วนของพืช โดยคาดว่าเป็นแหล่งที่มีจุลินทรีย์อุดมสมบูรณ์ มีความหลากหลายสูง นอกจากนี้การได้รับสารอาหารบางอย่างจากพืชยังอาจทำให้จุลินทรีย์นั้น ๆ มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชมากขึ้นด้วย (Noveriza and Quimio, 2004)

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* จากแหล่งที่มา คือ ถั่วเน่า ดินบริเวณรากพืชสมุนไพร และ ผิวของผลลำไย จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียจากทั้งสามแหล่ง สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ดีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเฉพาะแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่าสามารถยับยั้งการเจริญได้ถึง 39 ไอโซเลท ในขั้นตอนของการทดสอบขั้นต้นจะใช้การ spot เชื้อแบคทีเรียโดยตรงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบมีจำนวนมาก เมื่อใช้เทคนิคนี้สามารถทำให้การทดสอบเป็นไปได้อย่างสะดวกและรวดเร็ว แต่ไม่สามารถควบคุมปริมาณของเชื้อตั้งต้นได้ นอกจากนี้อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทยังมีความช้าเร็วต่างกัน ซึ่งเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่เจริญได้อย่างรวดเร็วอาจจะเกิดการเจริญแบบแข่งขันแย่งสารอาหารกับเชื้อรา ทำให้เชื้อราซึ่งเจริญได้ช้ากว่าไม่สามารถเจริญได้และทำให้ผลการคัดเลือกเป็นบวก ดังนั้นเมื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราในขั้นแรกได้แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเหลว NB และใช้น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมาทำการทดสอบแทนโดยคาดว่า เชื้อแบคทีเรียจะสร้างสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ในอาหารเหลวและปล่อยสารยับยั้งเชื้อราที่สร้างออกมานอกเซลล์ละลายอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ และเมื่อแยกน้ำเลี้ยงเชื้อออกมาทดสอบจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ แต่จากการทดลองพบว่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรานั้นจะเกิดขึ้นได้ต่อเมื่อมีการเจริญของโคโลนีของแบคทีเรียร่วมด้วย เมื่อทำการทดสอบโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองทำให้ปราศจากเซลล์และสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ

นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้โดยสิ้นเชิง แสดงให้เห็นว่าการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรานั้นไม่สามารถสร้างได้เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว เช่นเดียวกับการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ มาทดสอบกับเชื้อรา *L. theobromae* ในรายงานของสุมิตรา แสงวนิชย์ (2547) ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN 79, RS5 และ CMU2 ที่คัดมาเป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียของแต่ละแหล่งที่มายังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* อื่นๆนอกจากสายพันธุ์ CMUL ได้อีกสี่สายพันธุ์ คือ LP1, LP2, LG2 และ type strain 1120 แสดงให้เห็นว่าสามารถยับยั้งได้ครอบคลุมหลายๆสายพันธุ์ที่ได้มาจากแหล่งต่างๆกัน

นอกจากนี้ในการทดสอบด้วยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ และ ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ ยังพบว่าแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลท มีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงถึง 80 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างได้ตั้งแต่ pH 5 - 9 อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทคือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ pH 6 - 7 เพราะในช่วงอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกันนั้นมีจะผลต่อการเจริญและการผลิตสาร secondary metabolite ของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่นเชื้อ *B. subtilis* จะสามารถผลิต biosurfactant ได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในช่วง pH 4.5 - 10.5 (Makkar and Cameotra, 1999) การเพาะเลี้ยงในช่วงอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจะช่วยให้แบคทีเรียผลิตสารที่ต้องการในปริมาณมาก และสามารถที่จะพัฒนาเพื่อใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อผลิตสารที่ใช้ควบคุมเชื้อรา *L. theobromae* ได้ต่อไป

เนื่องจากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* แบบ dual culture test บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งเป็นอาหารแข็งในขั้นตอนของการทดสอบขั้นต้น พบว่าเมื่อเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญก็จะปล่อยสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราออกมาได้โดยเส้นใยของเชื้อราที่สัมผัสกับสารนั้นๆจะไม่เจริญต่อและเปลี่ยนเป็นสีดำ จากการสังเกตพบว่ามีบริเวณใสหรือ clear zone เกิดขึ้นระหว่างเส้นใยของเชื้อราที่ถูกยับยั้งการเจริญ และโคโลนีของแบคทีเรียแสดงให้เห็นว่าไม่ใช่ส่วนของเส้นใยที่สัมผัสกับตัวเซลล์ของแบคทีเรียโดยตรง แต่เป็นสารที่แบคทีเรียสร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์ (extra cellular metabolite) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ กล่าวคือสภาวะของอาหาร หรือ physical stage of culture medium มีผลโดยตรงต่อการสร้าง secondary metabolite ของเชื้อแบคทีเรีย ความแตกต่างนี้รวมไปถึงอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรีย การเกาะติดบนผิวหน้าอาหารของโคโลนี องค์ประกอบทางด้านชีวเคมีของตัวเชื้อแบคทีเรีย การปรับเปลี่ยนการแสดงออกของยีน (modification of gene expression) และรวมถึงสาร metabolite ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมาด้วย (Lorian,

1989; Holo *et al*., 2002) ตัวอย่างของเซลล์ที่มีรูปร่างผิดปกติเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสภาวะต่างกันก็คือเชื้อ *Escherichia coli* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและลดอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงลงจะพบเซลล์ที่มีรูปร่างผิดปกติมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง คุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดก็จะให้ผลต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกันในสภาวะที่แตกต่างกัน เช่น สารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* (*Enterococcus*) *feacalis* สามารถจะยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Neisseria gonorrhoeae* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Lorian, 1989) ทางด้านความสามารถในการเจริญก็พบความแตกต่างเช่น แบคทีเรีย *Pneumococcus* spp. ที่แยกได้จากเลือดที่ติดเชื้อและมีอัตราการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ พบว่ายังสามารถมีชีวิตรอดและแบ่งตัวเพิ่มขึ้นได้ในอาหารแข็งเมื่อแยกเชื้อมาในขั้นแรกแต่ไม่สามารถเจริญได้เลยเมื่อเพาะเชื้อที่ได้จากเลือดโดยตรงในอาหารเหลว (Gillespie, 1913) และด้านการผลิตสาร metabolite ก็พบว่ามีความแตกต่างเช่นเชื้อแบคทีเรีย *Pneumococcus* และ เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* บางชนิด สามารถผลิตสาร beta-hemolysis ได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเท่านั้น (Lorian, 1989)

นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยอีกสองประการที่มีความเป็นไปได้ คือความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียและการสะสมเพิ่มพูนของสารยับยั้งเชื้อรา เช่น ความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย *Pneumococcus* spp. ในการทดลองของ Gillespie เหตุผลว่าอาจเป็นเพราะการเจริญของ *Pneumococcus* spp. ที่แยกมาจากเลือดในเบื้องต้นจำเป็นจะต้องได้รับสารบางอย่างที่แต่ละเซลล์ผลิตออกมาและช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ใกล้ชิดกัน ดังนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งจึงมีอัตราการรอดชีวิตและแบ่งเซลล์เพิ่มได้มากกว่า ส่วนในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเซลล์มีความหนาแน่นต่ำและสารที่ผลิตออกมาไม่สามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์อื่นๆได้จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (Gillespie, 1913) ในการทดลองนี้ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน เพราะเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทในอาหารเหลวสารยับยั้งเชื้อราที่แบคทีเรียสร้างขึ้นอาจเจือจางลงและสูญเสียไปในระหว่างการบ่มได้ อีกประการหนึ่งคือเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารวุ้นแข็งจะมีการสะสมสารยับยั้งเชื้อราไว้เป็นจำนวนมากเนื่องจากการจะซึมผ่านอาหารวุ้นแข็งนั้นเป็นไปได้ช้าทำให้ สารยับยั้งเชื้อรา มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมาก (Lorian, 1989) จนเพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ ดังนั้นการสกัดสารยับยั้งเชื้อราดังกล่าวจึงต้องสกัดจากอาหารวุ้นแข็งเท่านั้น (Holo *et al*., 2002) และสารสกัดจากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลท ก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์ CMUL, LP1, LP2, LG2 และ type strain 1120 ได้ ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจะลดลงน้อยกว่าการใช้เซลล์ก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของสารยับยั้งเชื้อราได้ถูกเจือจางลงไปด้วยหลังถูกสกัดออกมาจากอาหารวุ้นแข็ง

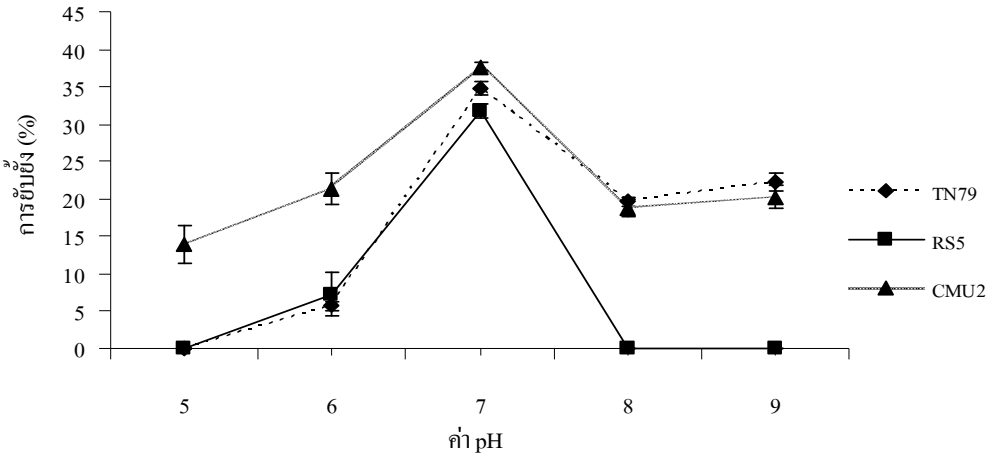
บทที่ 5

การทดสอบความเสถียรและการตรวจสอบชนิดของสารสกัดจากแบคทีเรีย

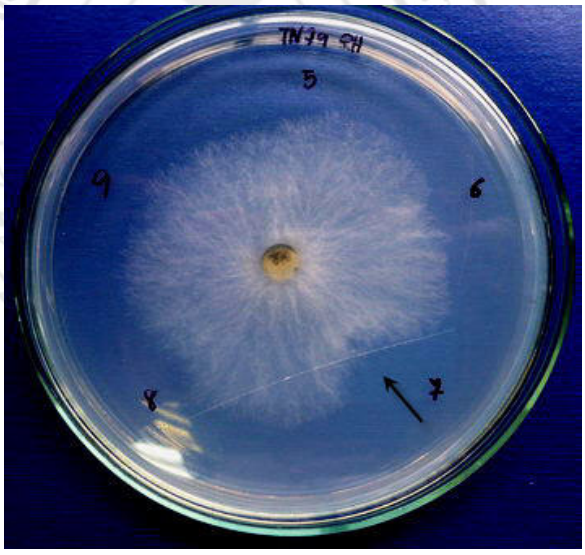
5.1 การทดสอบความเสถียรของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย

5.1.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL เมื่อสกัดสารโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่าง ๆ กัน

จากการสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากแบคทีเรีย TN79, RS5 และ CMU2 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 5, 6, 7 ,8 และ 9 เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL พบว่าสารสกัดหยาบจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ดีที่สุด (ภาพที่ 5.2) โดยสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ร้อยละ 37.68 ไอโซเลทที่ TN79 เท่ากับร้อยละ 34.78 และไอโซเลทที่ RS5 เท่ากับร้อยละ 31.82 (ภาพที่ 5.1) และจะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU 2 สามารถใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 5 - 9 สกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 ไม่สามารถสกัดสารยับยั้งเชื้อราได้ ที่ pH 5 ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 นั้นพบว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ที่ 5, 8 และ 9 สกัดสาร พบว่าไม่สามารถสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้



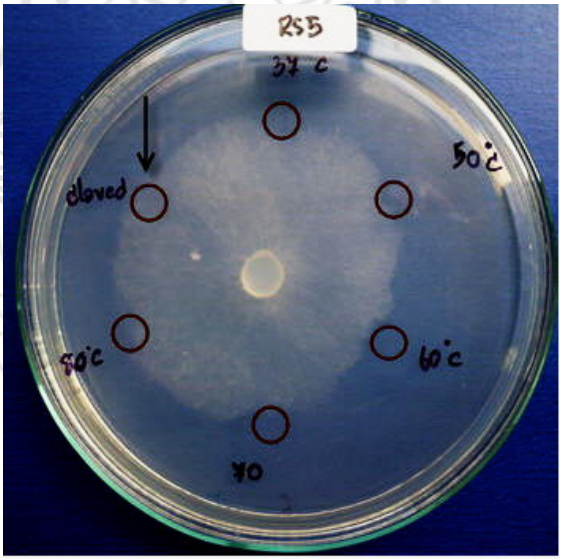
ภาพที่ 5.1 ค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเป็นร้อยละ เมื่อสกัดสารจากแบคทีเรียโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 5 - 9



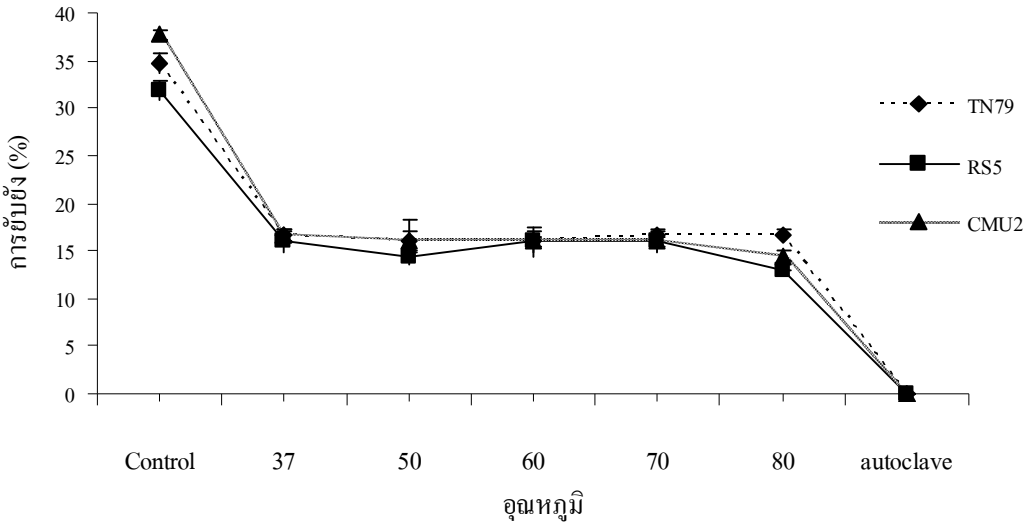
ภาพที่ 5.2 ผลของ pH ของสารสกัดจากแบคทีเรีย TN79 ต่อเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยบริเวณที่ลูกศรชี้คือ ค่า pH เท่ากับ 7 จะเห็นได้ว่ามีการเว้าของเชื้อรามากกว่าที่ pH อื่น ๆ (18 -19 ชั่วโมง)

5.1.2ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL เมื่อนำสารสกัดหยาบไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ของแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทไปแช่ในวอเตอร์บาทที่อุณหภูมิ 37, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสนานหนึ่งชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบกับเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ผลการทดสอบพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราลดลงมาก (ภาพที่ 5.4) เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบที่ไม่ได้ให้ความมาร้อนก่อน แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา ส่วนค่าการยับยั้งเป็นร้อยละในทุกอุณหภูมิที่ได้ทำการทดสอบไม่มีความแตกต่างกันมากนักโดยประสิทธิภาพของการยับยั้งของสารสกัดจากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทอยู่ระหว่างร้อยละ 13.04 - 16.67 ยกเว้นเมื่อนำสารสกัดหยาบไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว พบว่าสูญเสียประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราโดยสิ้นเชิง เห็นได้จากการที่เส้นใยของเชื้อราเมื่อสัมผัสกับสารสกัดหยาบไม่มีการหยุดชะงักการเจริญ (ภาพที่ 5.3)



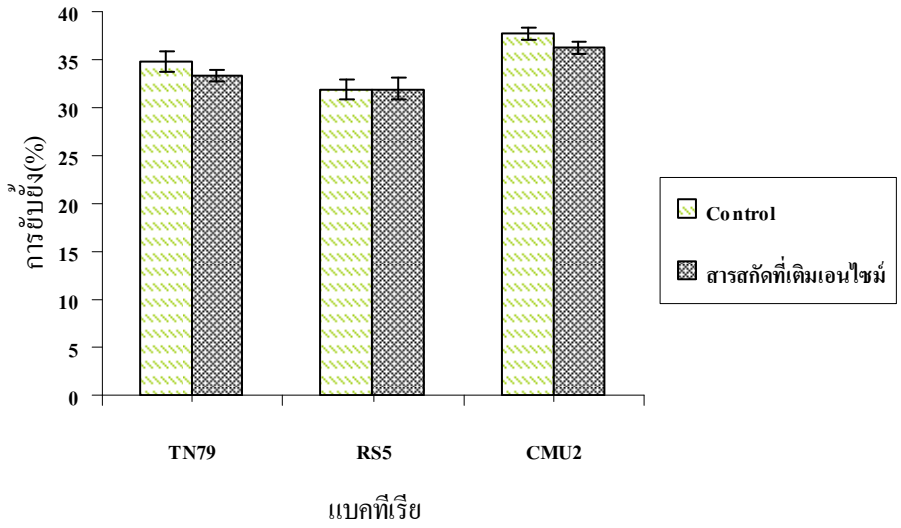
ภาพที่ 5.3 สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 นำไปผ่านความร้อนที่121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราโดยเส้นใยเจริญทับบริเวณที่หยดสาร (วงกลม) ไปโดยไม่มีการหยุดชะงักการเจริญ (บริเวณที่ลูกศรชี้)



ภาพที่ 5.4 ค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเป็นร้อยละเมื่อนำสารสกัดจากแบคทีเรีย ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ ต่าง ๆ เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมงเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้นำไปผ่านความร้อน

5.1.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนของสารสกัดหยาบ

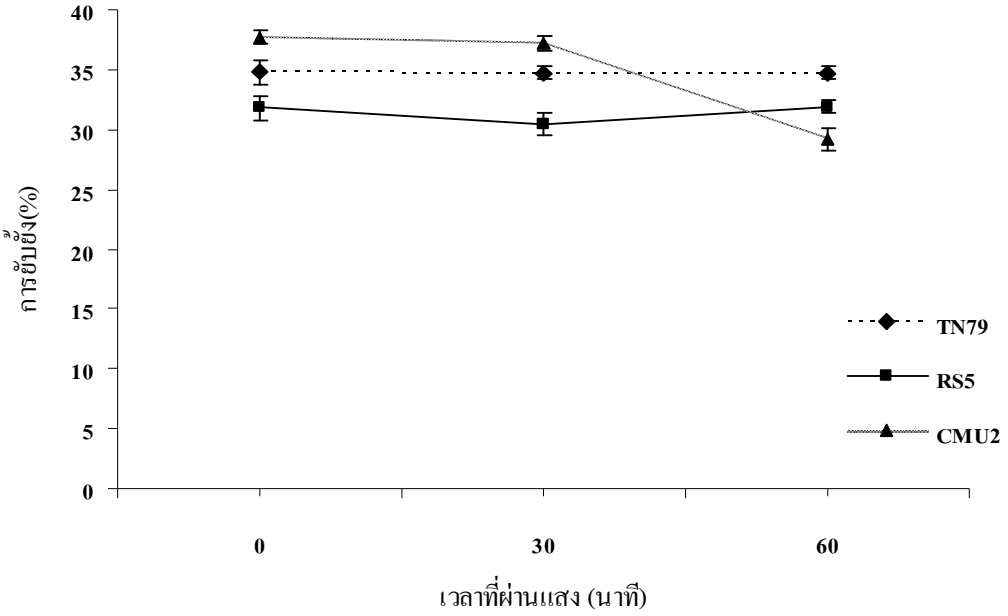
เมื่อนำสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลท ไปเติมเอนไซม์ proteinase K ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL พบว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีน proteinase K ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่เอนไซม์ จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นร้อยละไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 5.5) โดยสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 ยังมีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงที่สุดที่ร้อยละ 36.23 (ภาพที่ 5.7 ก) รองลงมาคือแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 ร้อยละ 33.23 และแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 เท่ากับร้อยละ 31.88



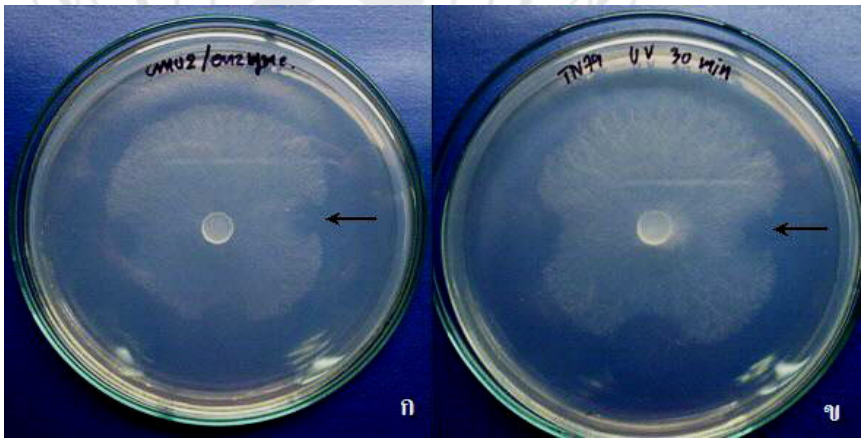
ภาพที่ 5.5 ค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเป็นร้อยละ เมื่อเติมเอนไซม์ลงในสารสกัดจากแบคทีเรียเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง

5.1.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทนต่อรังสีอัลตราไวโอเลตของสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทไปรับแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 30 นาที และ 1 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วจึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* พบว่าสารสกัดจากแบคทีเรียที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลทเป็นเวลา 30 นาทียังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมโดยสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 ยังมีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงที่สุดที่ร้อยละ 37.18 รองลงมาคือแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 ร้อยละ 34.72 (ภาพที่ 5.7 ข) และแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 เท่ากับร้อยละ 30.43 และสารสกัดที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลทเป็นเวลา 60 นาทียังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ โดยสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 ประสิทธิภาพการยับยั้งสูงที่สุดที่ร้อยละ 34.72 รองลงมาคือแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 เท่ากับร้อยละ 31.88 แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 29.17 (ภาพที่ 5.6)

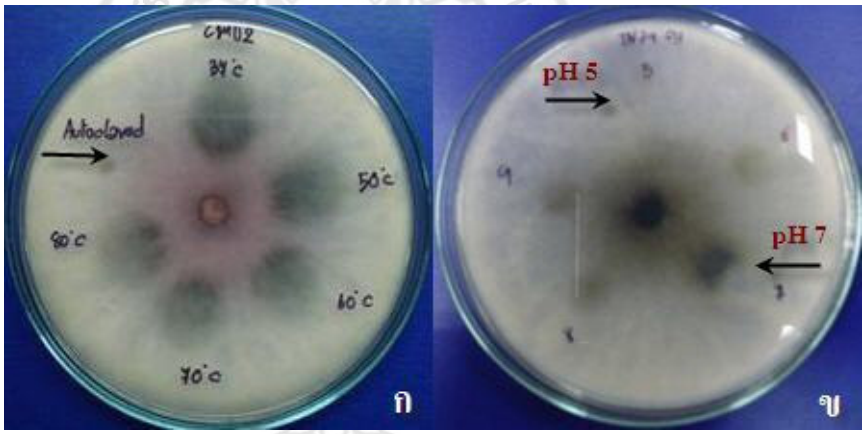


ภาพที่ 5.6 ค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเป็นร้อยละ เมื่อนำสารสกัดจากแบคทีเรีย ไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลาสามสิบนาทีและหนึ่งชั่วโมงเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต



ภาพที่ 5.7 (ก) การเว้าของเส้นใยของเชื้อราเมื่อทดสอบกับสารสกัดจากแบคทีเรีย CMU2 ที่เติมเอนไซม์proteinase K (ข) แสดงให้เห็นการเว้าของเส้นใยของเชื้อราเมื่อทดสอบกับสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย TN79 ที่นำไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 30 นาที

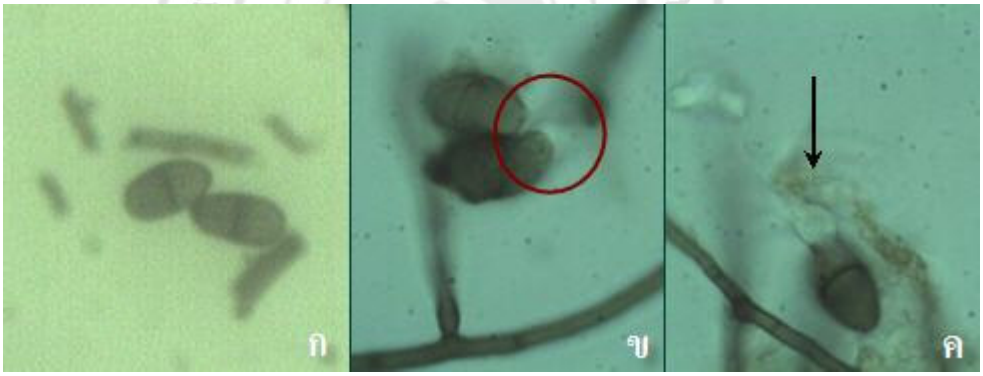
การใช้สารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียจะทำให้เชื้อราหยุดชะงักการเจริญในบริเวณที่สัมผัสกับสารสกัดแต่เมื่อบ่มต่อไปเชื้อราจะสามารถเจริญทับบริเวณที่มีสารสกัดไปได้ แต่สามารถสังเกตได้ว่าสารสกัดจากแบคทีเรียมีผลต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราจริงเมื่อบ่มเชื้อราจนมีอายุ 24 - 48 ชั่วโมงบริเวณที่เส้นใยของเชื้อราสัมผัสกับสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียจะมีการเปลี่ยนสีเป็นสีดำเห็นได้ชัดเจน และบริเวณที่สารสกัดจากแบคทีเรียที่ไม่มีผลต่อการเจริญต่อเส้นใยของเชื้อราเส้นใยของเชื้อราก็จะไม่เปลี่ยนเป็นสีดำเช่นในภาพที่ 5.8 (ก) สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท CMU2 ที่ผ่านการ autoclave ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้พบว่าเส้นใยบริเวณนั้นไม่มีการเปลี่ยนเป็นสีดำ เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิอื่น ๆ นอกจากนี้ในเกิดสีดำของเส้นใยของเชื้อราบริเวณที่สัมผัสกับสารสกัดหากสารสกัดนั้น ๆ มีร้อยละของการยับยั้งสูงก็จะมีบริเวณที่เป็นสีดำมากกว่าไปด้วยเช่น ภาพที่ 5.8 (ข) สารสกัดจากแบคทีเรีย TN79 pH 7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้สูงสุดจะเห็นได้ว่ามีบริเวณที่เป็นสีดำมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ pH 5 ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้เส้นใยส่วนนี้ก็จะไม่เปลี่ยนเป็นสีดำ แต่เมื่อทิ้งไว้จนเส้นใยแก่จัดเส้นใยทั้งหมดก็จะเปลี่ยนเป็นดำตามปกติ



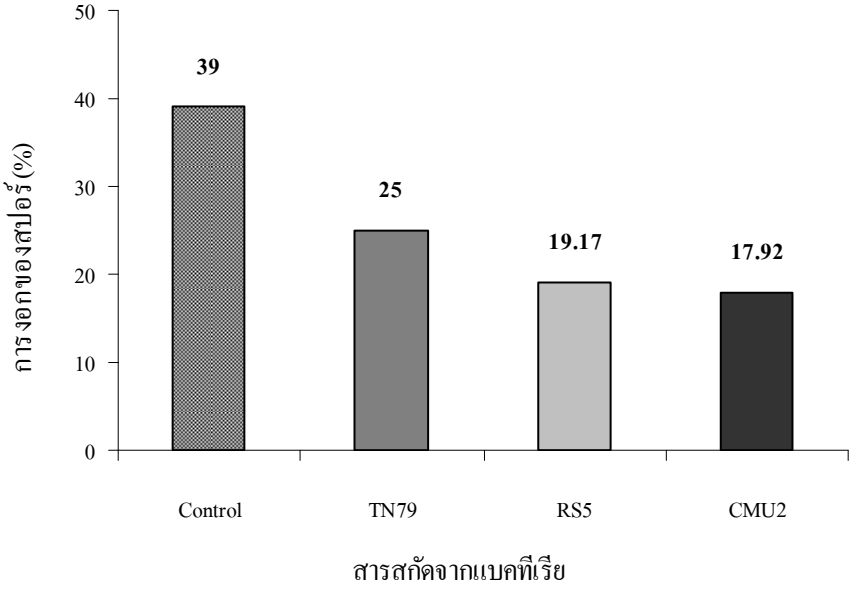
ภาพที่ 5.8 เส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ที่บ่มไว้นาน 2 วัน (ก) เส้นใยบริเวณที่สัมผัสกับสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย CMU2 เปลี่ยนเป็นสีดำยกเว้นสารสกัดที่ผ่านการ autoclaved (ข) สารสกัดจากแบคทีเรีย TN79 pH 7 มีบริเวณที่เป็นสีดำมากที่สุดเมื่อเทียบกับบริเวณที่หยดสารสกัดที่ pH 5

5.2 การทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยใช้สารสกัดจากแบคทีเรีย

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยใช้สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 โดยกำหนดจำนวนเริ่มต้นประมาณ 5 x 10^3 สปอร์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนสารสกัดจากแบคทีเรียโดยสปอร์จะเริ่มมีการงอกที่ 1 - 2 ชั่วโมงเริ่มประเมินการยับยั้งของการงอกของสปอร์หลังจากใส่สารสกัดและน้ำกลั่นเป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมงเพราะสามารถมองเห็นได้ชัดเจนที่สุด(ภาพที่ 5.9 ก - ค) ผลการทดลองพบว่าในกลุ่มควบคุมสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL มีการงอกคิดเป็นร้อยละ 39.00 ในกลุ่มที่เติมสารสกัดจากแบคทีเรียพบว่ากลุ่มที่เติมสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีการงอกของสปอร์คิดเป็นร้อยละ 25.00 ลดลงจากกลุ่มควบคุมคิดเป็นร้อยละ 39.50 กลุ่มที่เติมสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 พบว่ามีการงอกของสปอร์คิดเป็นร้อยละ19.17 ลดลงจากกลุ่มควบคุมร้อยละ 50.85 และกลุ่มที่เติมสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 พบว่ามีการงอกของสปอร์คิดเป็นร้อยละ17.92 ลดลงจากกลุ่มควบคุมร้อยละ 54.05 (ภาพที่ 5.10)



ภาพที่ 5.9 สปอร์ของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* CMUL (ก) สปอร์ที่ยังไม่งอก (ข) สปอร์เริ่มงอกเมื่อเวลาผ่านไป 1 - 2 ชั่วโมง และ (ค) สปอร์เริ่มงอกยาวขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง (100X)



ภาพที่ 5.10 ร้อยละของการงอกของสปอร์เมื่อเติมสารสกัดจากแบคทีเรียเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัดจากแบคทีเรีย

5.3 การตรวจสอบชนิดของสารสกัดจากแบคทีเรีย gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS)

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 พบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทสามารถแยกออกเป็นสารประกอบได้มากกว่า 50 ชนิดปะปนกันโดยมากเป็นสารประกอบอินทรีย์ได้แก่ สารประกอบพวกกรดไขมันทั้งอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว สารประกอบคาร์บอกซิลิก สารประกอบคีโตน สารประกอบเอสเทอร์ สารประกอบอโรมาติก และ สารประกอบพวกฟีนอล แอลกอฮอล์ และ กรดอมิโน

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีสารประกอบที่เป็นไปได้ทั้งหมด 56 ชนิดจาก 45 รีเทนชั่นไทม์ สารประกอบที่พบมาก 3 อันดับแรกได้แก่ Octadec-9-enoic acid ร้อยละ 43.86 Isobutyric acid ร้อยละ 6.62 และ trans-Oleic acid ร้อยละ 5.94 สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 มีสารประกอบที่เป็นไปได้ทั้งหมด 69 ชนิดจาก 59 รีเทนชั่นไทม์ องค์ประกอบที่พบมาก 3 อันดับแรกได้แก่ Isobutyric acid ร้อยละ 9.37, 4-diaza-2,5-

dioxobicyclo[4.3.0] nonane หรือ Pyrrolo[1,2-a]piperazine-3,6-dione ร้อยละ 6.74 และ Butanoic acid ร้อยละ 5.15 สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 มีสารประกอบที่เป็นไปได้ทั้งหมด 75 ชนิดจาก 59 รีเทนชั่นไทม์ สารประกอบที่พบมาก 3 อันดับแรกได้แก่ trans-Oleic acid ร้อยละ 10.60 Benzeneacetaldehyde ร้อยละ 8.93 และ Isobutyric acid ร้อยละ 7.77 โดยปกติในแต่ละรีเทนชั่นไทม์ จะแสดงสารประกอบที่เป็นไปได้ทั้งหมดสามชนิดเรียงตามร้อยละในเชิงคุณภาพ(qualitative analysis) และในผลการทดลองจะนับเฉพาะสารประกอบที่มีร้อยละในเชิงคุณภาพสูงที่สุดมาเป็นตัวแทนของแต่ละรีเทนชั่นไทม์ แต่ในบางกรณีที่รีเทนชั่นไทม์เดียวกัน สารประกอบสองชนิดมีค่าร้อยละในเชิงคุณภาพเท่ากันก็จะระบุไว้ในผลการทดลองทั้งสองชนิด(ภาคผนวก ค) เช่น สารประกอบ3-Phenylpyridine, 1,4-diaiza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nonane และ Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro- ในสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย TN79 ที่รีเทนชั่นไทม์ 25.034 สารประกอบทั้งสองชนิดมีค่าร้อยละในเชิงคุณภาพเท่ากันคือร้อยละ 59 แสดงว่าในรีเทนชั่นไทม์นั้นๆ สารประกอบที่แยกได้อาจจะเป็น3-Phenylpyridine,1,4-diaiza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nonane หรือ Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro- ก็ได้

เมื่อนำสารประกอบที่แยกได้จากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทมาเปรียบเทียบกัน พบว่ามีสารประกอบที่เหมือนกันทั้งหมด 9 ชนิดคือ Isobutyric acid, 2-Methylbutanoic acid, Benzeneacetaldehyde, 1,4-Pentanediamine, N1,N1-diethyl-, 3-Phenylpyridine, 1,4-diaiza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nonane หรือ Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-, Octadec-9-enoic acid และ trans-Oleic acid เนื่องจากความแม่นยำที่เป็นที่ยอมรับโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GCMS เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล National Institute of Standards and Technology (NIST) Library Rev.D.03.00 จะยอมรับที่ร้อยละในเชิงคุณภาพสูงตั้งแต่ร้อยละ 99 ขึ้นไป กล่าวคือมีความเหมือนของเลขมวลที่ตรวจจับได้กับฐานข้อมูล มากอย่างน้อยร้อยละ 99 นั่นเอง ดังนั้นจากสารประกอบทั้ง 9 ตัวที่เหมือนกันของแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทนี้ สารประกอบที่สามารถระบุชนิดได้แน่นอนเพราะมีร้อยละในเชิงคุณภาพเท่ากับ 99 มีเพียงสองตัวคือ Octadec-9-enoic acid และ trans-Oleic acid เท่านั้น (ตารางที่ 5.1)

ตารางที่ 5.1 สารประกอบที่เหมือนกันของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียสามชนิดและร้อยละในเชิงคุณภาพเมื่อเทียบกับฐานข้อมูล

Compounds	Quality		
	TN79	RS5	CMU2
Octadec-9-enoic acid	99	99	96
trans-Oleicacid	99	99	99
Benzeneacetaldehyde	87	70	87
2-Methylbutanoic acid	83	72	83
3-phenylpyridine	81	93	93
*1,4-diaza-2, 5-dioxo-3-isobutyl bicyclo [4.3.0]nonane or	59	91	91
* Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-	59	91	91
Isobutyric acid	59	42	64
1,4-Pentanediamine, N1,N1-diethyl-	43	47	43

* หมายถึง อยู่ในรีเทนชั่นไทม์เดียวกัน

5.4 อภิปรายผล

เมื่อทำการสกัดสาร secondary metabolite จากแบคทีเรียได้แล้วนอกจากจะทดสอบว่ายังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ได้หรือไม่แล้ว ยังต้องมีการทดสอบความเสถียรของสารสกัดอีกด้วย โดยปกติแบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis* จะมีการผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ หลายชนิดรวมถึงสารปฏิชีวนะและไฮโดรไลติกเอนไซม์ต่างๆ ดังนั้นเพื่อวิเคราะห์ชนิดของสารและเพิ่มพูนประสิทธิภาพในการนำสารเหล่านี้ไปใช้งาน จึงต้องมีการทดสอบความเสถียรของสารดังกล่าวเช่น การทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน การทนต่อสภาวะความเป็นกรดด่าง การทนต่อความร้อนสูง และแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบในทางธรรมชาติในการนำสารเหล่านี้ไปใช้งานจริง โดยผลจากการทดสอบสารสกัดที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 พบว่ามีความเสถียรต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน proteinase K มีความเสถียรต่อแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร มีความ

เสถียรต่ออุณหภูมิสูงในช่วง 37 - 80 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถรักษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เมื่อนำไปผ่านการให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วโดยมีข้อสังเกตคือเมื่อนำไปให้ความร้อนเป็นเวลา 1 ชั่วโมงพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราลดลงมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเป็นเพราะการให้ความร้อนเป็นเวลานานทำให้พันธะเคมีของสารประกอบต่าง ๆ ในสารสกัดที่มีความเสถียรต่ำเช่นกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมรวมทั้งคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารอาจเปลี่ยนไปด้วย นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราคือ ค่าความเป็นกรดด่างหรือค่า pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่นำไปสกัดสารจากอาหารวุ้นแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท RS5 ที่ค่า pH 5, 8 และ 9 และสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 ที่ค่า pH เท่ากับ 5 พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ เนื่องจากยังไม่ทราบว่าสารประกอบที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทนั้นเป็นสารชนิดใด จึงไม่สามารถระบุสาเหตุที่มีผลกระทบได้ แต่สันนิษฐานว่า ที่ค่า pH ดังกล่าว การทำละลายของสารยับยั้งเชื้อราในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ อาจจะไม่สมบูรณ์ทำให้สกัดออกจากอาหารวุ้นได้ไม่หมดหรือได้น้อยมากทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ และพบว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจะเกิดได้ดีที่สุดเมื่อ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มีค่าเป็นกลางคือเท่ากับ 7 จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียในบทที่สี่ จะเห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย RS5 เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวที่เจริญได้ในอาหารที่มีค่า pH เท่ากับ 4 แล้วยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ด้วย แต่ผลจากการทดสอบสกัดสารยับยั้งเชื้อราด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5 พบว่าสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย CMU2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย RS5 อาจเป็นเพราะการทดสอบหา pH ที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียในบทที่สี่นั้น แบคทีเรียไอโซเลท RS5 เป็นเชื้อเดียวที่เจริญได้ดี และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบยังคงมีเซลล์ของแบคทีเรียเหลืออยู่ทำให้มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CMU2 และ TN79 นั้นเจริญได้ไม่ดีในอาหารที่มี pH 4 แต่การสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรานั้น แบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 7 เท่ากัน และใช้ฟอสเฟตบับเฟอร์ที่มีค่า pH ต่าง ๆ กันมาใช้สกัดสารการที่สารสกัดจาก CMU 2 มากกว่า ไอโซเลทอื่นอาจเป็นเพราะ การสกัดสารยั้บยั้งการเจริญของเชื้อราออกมาจากอาหารวุ้นของเชื้อแบคทีเรีย CMU2 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5 - 7 นั้นสามารถสกัดได้มากกว่าเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ เนื่องจากมีการสะสมของสารยับยั้งเชื้อรามากกว่า หรือมีการทำละลายที่ดีกว่าเชื้ออื่นๆ ก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราโดยใช้สารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทยังไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ดีเท่ากับการใช้เซลล์ของแบคทีเรียในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเมื่อบ่มเชื้อรากับสารสกัดไว้นาน

กว่า 24 ชั่วโมงจะพบว่าเส้นใยที่มีการชะงักการเจริญในตอนแรกนั้น สามารถเจริญต่อทับบริเวณที่หยดสารสกัดจากแบคทีเรียได้โดยที่เส้นใยบริเวณที่เจริญทับสารสกัดนั้น ๆ พบว่ามีการเปลี่ยนสีเป็นสีดำอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่เส้นใยบางส่วนมีการฉีกขาดเนื่องจากผนังเซลล์ถูกทำลายก็เป็นได้ (Barsha and Ulaganathan, 2002) แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งหมด ซึ่งสาเหตุอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากแบคทีเรียมีความเข้มข้นของสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรานั้นน้อยเกินไป

และเมื่อนำสารสกัดจากแบคทีเรียมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา พบว่าสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทมีผลต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อราทำให้อัตราการงอกของสปอร์ของเชื้อราลดลง อย่างไรก็ตามสปอร์ของเชื้อรามีอัตราการงอกค่อนข้างต่ำ ซึ่งอาจเป็นเพราะสภาวะที่ใช้ในการทดสอบ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณอาหาร และ ระยะเวลาที่ใช้ทดสอบอาจจะยังไม่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์ ในกลุ่มควบคุมพบว่ามีการงอกเพียงร้อยละ 39 เท่านั้นและมีความยาวของ germ tubes ไม่สม่ำเสมอ ไม่พบความแตกต่างของลักษณะของ germ tubes แต่อย่างใด นอกจากนี้ปัญหาที่พบอีกอย่างหนึ่งคือ เชื้อรา *L. theobromae* ไม่สร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถเก็บสปอร์ของเชื้อรา กล้วยที่เพาะเลี้ยงเชื้อราไว้นานจนเปลือกนอกมีลักษณะแห้งแข็งและมีสีดำสนิทมีซึ่งใช้เวลาไม่ต่ำกว่าหนึ่งเดือน การเก็บสปอร์ทำได้ยากและได้มีจำนวนสปอร์น้อย นอกจากนี้ยังมีเศษเนื้อของกล้วยและเส้นใยของเชื้อรามาปะปนมากทำให้มองเห็นสปอร์ของเชื้อราได้ยากอีกด้วย

จากผลการตรวจหาสารประกอบที่มีอยู่ในสารสกัดจากแบคทีเรียโดยใช้เครื่องมือ GCMS เนื่องจากเป็นสารสกัดหยาบจึงทำให้แยกสารประกอบออกได้มากกว่าห้าสิบชนิดในแต่ละสารสกัด และสารสกัดจากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทมีสารประกอบที่เหมือนกันอยู่เก้าชนิด โดยสามารถยืนยันชนิดและระบุชื่อสารได้แน่นอนถึงร้อยละ 99 เพียงสองตัวคือ Octadec-9-enoic acid และ trans-Oleic acid ส่วนสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 ยังมีสารในกลุ่มเดียวกันและสามารถยืนยันชื่อได้ถึงร้อยละ 99 อีกชนิดหนึ่งคือ oleic acid ซึ่งทั้งหมดที่กล่าวมาเป็นสารประกอบในกลุ่ม fatty acid ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าสารกลุ่มนี้เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* เนื่องจากเป็นที่ทราบกันว่า fatty acid มีคุณสมบัติเป็น antifungal และ antibactericidal เช่น oleic acid มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus* spp.ได้ (Kabara *et al*., 1972) นอกจากนี้ในกรณีของกรดไขมันไม่อิ่มตัวก็มีรายงานการเป็น antifungal fatty acid ด้วยเช่นกัน เช่นสารประกอบ *cis*-9-Heptadecenoic acid ซึ่งสกัดได้จากเชื้อยีสต์ *Pseudozyma flocculosa* ที่เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ของกลุ่มเชื้อราที่ก่อโรค powdery mildew ในแตงกวาได้แก่เชื้อ *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., *Cladosporium cucumerinum*, *Pythium*

aphanidermatum(Edson) Fitzp. และ *Phytophthora infestans* (Mont.) โดยมีผลยับยั้งการเจริญของของเชื้อราเหล่านี้ในห้องปฏิบัติการ และยังสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Sphaerotheca fuliginea* ได้ดีมากอีกด้วย มีสมมุติฐานว่า *cis*-9-Heptadecenoic acid สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเราเหล่านี้ได้โดยเข้าไปแทรกในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราในส่วนของฟอสโฟไลปิด โดยเฉพาะในเชื้อราที่มีสาร sterol ต่ำซึ่งจะให้มีช่องว่างให้สาร *cis*-9-Heptadecenoic acid และกรดไขมันอื่น ๆ ที่ปะปนอยู่ เข้าไปแทรกได้ปริมาณมากทำให้ของเหลวในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราเสียสมดุลจนมีผลกระทบต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราทำให้มีการหยุดชะงักการเจริญ ซึ่งผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อราจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร sterol ในเซลล์เมมเบรนของเชื้อราแต่ละชนิด (Avis and Bélanger, 2000) การเปลี่ยนแปลงของของเหลวในเซลล์เมมเบรนนี้ไม่ได้ทำให้เชื้อราตายเพราะ *cis*-9-Heptadecenoic acid และ fatty acid อื่น ๆ ไม่ได้เป็นพิษต่อเชื้อราแต่ทำให้เชื้อราเกิดการชะงักการเจริญ ซึ่งรายงานนี้สอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้นที่เส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* เกิดการชะงักการเจริญเมื่อสัมผัสกับสารสกัดจากแบคทีเรีย แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปก็จะสามารถเจริญต่อได้แต่เห็นจะการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยของเชื้อราเป็นสีดำอย่างชัดเจน

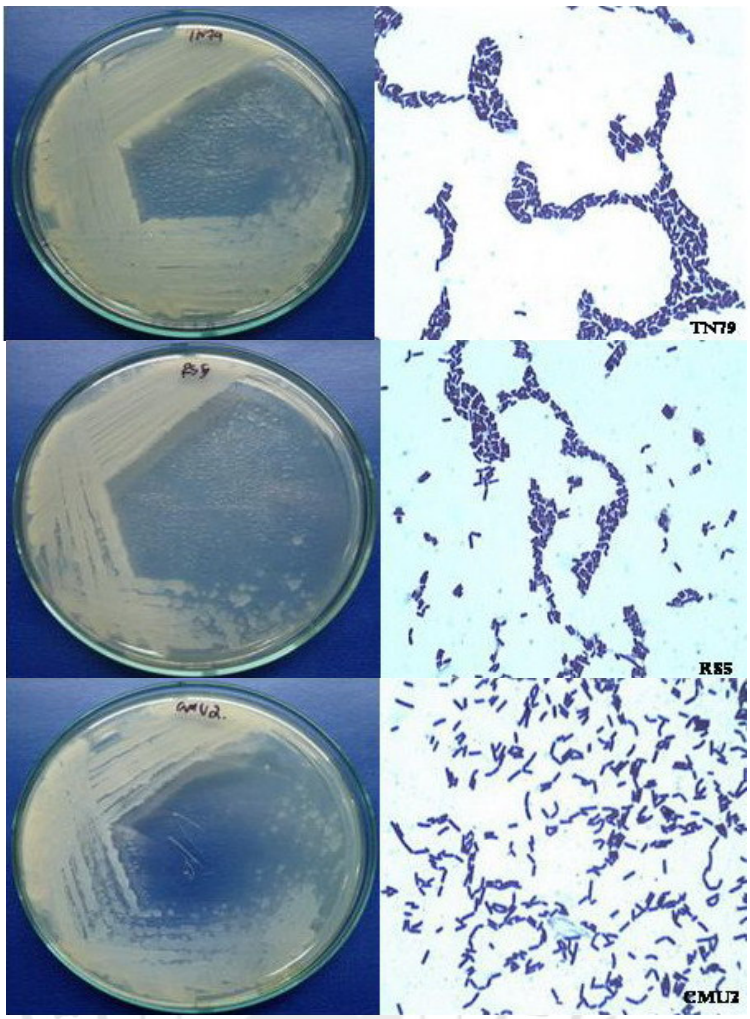
อย่างไรก็ตามที่กล่าวมาเป็นเพียงสมมุติฐานเท่านั้นยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าสาร Octadec-9-enoic acid และ trans-Oleic acid เป็นสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้จริงเนื่องจากยังไม่สามารถทำการแยกเป็นสารบริสุทธิ์ออกมาเพื่อทดสอบซ้ำกับเชื้อราได้ และจากการทดสอบโดยใช้เซลล์ของแบคทีเรียทั้ง TN79, RS5 และ CMU2 พบว่าเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ในบริเวณรอบ ๆ เชื้อแบคทีเรียไม่เจริญต่อแต่อย่างใด ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่ามีสารประกอบมากกว่า 1 ชนิดทำงานร่วมกันทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญต่อได้และความเข้มข้นของสารที่แบคทีเรียผลิตออกมาอย่างต่อเนื่องก็น่าจะมีผลด้วยเช่นกัน นอกจากนี้เนื่องจากเทคนิค GC-MS ใช้แยกสารประกอบที่สามารถระเหยเป็นก๊าซได้เท่านั้นและใช้ความร้อนสูงในการแยกโมเลกุลขององค์ประกอบของสารทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์สารประกอบอื่น ๆ ในสารสกัดที่ไม่สามารถระเหยเป็นก๊าซได้ จึงอาจจะต้องใช้เทคนิคอื่นในการวิเคราะห์สารต่อไปเพื่อให้ทราบชนิดของสารประกอบอื่น ๆ ที่อยู่ในสารสกัดจากแบคทีเรียนี้

บทที่ 6

การระบุชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TN79, RS5 และ CMU2

6.1 การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

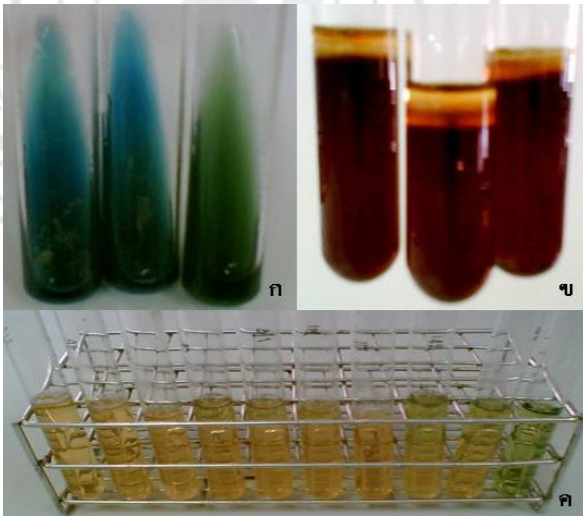
คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจาก stock culture ทั้งสามแหล่งที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ มา 9 ไอโซเลท ได้แก่ TN117, TN142, TN133, TN112 และ TN79 ที่แยกได้จากถั่วเน่า RS3 และ RS5 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากพืชสมุนไพร CMU2 และ CMU3 ที่แยกได้จากผิวของผลลำไย มาทำการตรวจสอบรูปร่างลักษณะพบว่าทั้งเก้าไอโซเลทมีโคโลนีขนาดประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตร มีสีขาวขุ่นทึบแสง ผิวหน้าไม่เรียบและเมื่อใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยมีลักษณะเยิ้ม ยกเว้นไอโซเลทที่ CMU3 ตรวจสอบการติดสีแกรมพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลท ติดสีแกรมบวกและมีรูปร่างเป็นท่อน (bacilli) มีเอนโดสปอร์แบบ central และไม่มี capsule (ภาพที่ 6.1)



ภาพที่ 6.1 ลักษณะโคโลนีและลักษณะของเซลล์ที่ย้อมสีแกรมของแบคทีเรียตัวแทน 3 ไอโซเลท คือ TN79, RS5 และ CMU2

6.2 การตรวจสอบทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกแบคทีเรีย

จากการตรวจสอบทางชีวเคมีพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลท เมื่อทดสอบด้วย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดฟองก๊าซออกซิเจนแสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้ สามารถเคลื่อนที่ได้เมื่อศึกษาโดยวิธี Hanging drop technique สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ สามารถใช้ซิเตรทได้ ผลที่ได้จากการทดสอบ คือ อาหาร simmon citrate agar เปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน (ภาพที่ 6.2 ก) ผลทดสอบ MR เป็นลบเนื่องจากเมื่อหยดเมทิลเรดลงไปไม่เกิดสีแดง แต่สามารถสร้างอะซีโตอินได้เนื่องจากเมื่อทดสอบด้วย 10% แอลฟาแนปทอลและ 20% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ผลการทดสอบมีสีแดงเชอรี่ VP reaction จึงเป็นบวก สามารถสร้างอินโดลได้โดยเมื่อหยดสารโคแวกซ์ลงไปพบว่าเกิดเป็นชั้นสีแดงขึ้น (ภาพที่ 6.2 ข) สามารถเจริญบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 7.5% และ สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล 4 ชนิดคือ กลูโคส แมนนิทอล ไซโลส และอาราบิโนสโดยเปลี่ยนสีของอาหารให้เป็นสีเหลือง (ภาพที่ 6.2 ค) จากผลการทดสอบทางชีวเคมี แบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลท จัดอยู่ในจีนัส *Bacillus* spp. เมื่อจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 8 และ เมื่อเทียบผลที่ได้กับตารางของ MacFaddin จะเห็นได้ว่ามีความใกล้เคียงที่สุดกับ *B. subtilis* และ *B. licheniformis* (ตาราง 6.1) (MacFaddin, 2000) (ภาคผนวก ก)



ภาพที่ 6.2 การทดสอบทางชีวเคมี (ก) การทดสอบการใช้ซิเตรท (ข) การทดสอบการสร้างอินโดล (ค) การทดสอบการสร้างกรดจากน้ำตาล

ตารางที่ 6.1 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียตัวแทนทั้ง 9 ไอโซเลท

ลักษณะที่ศึกษา	สายพันธุ์แบคทีเรีย										
	TN117	**TN142**	**TN133**	**TN112**	**TN79**	**RS3**	**RS5**	**CMU2**	**CMU3**	***Bacillus subtilis*** [a]	***Bacillus llicheniformis*** [a]
shape of cells	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
spore position	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+
glucose [b]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
manitol [b]	$+^{m}$	+	+	+	+	$+^{m}$	+	+	$+^{m}$	+	+
xylose [b]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
arabinose [b]	$+^{w}$	$+^{m}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	+	+
starch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 7.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

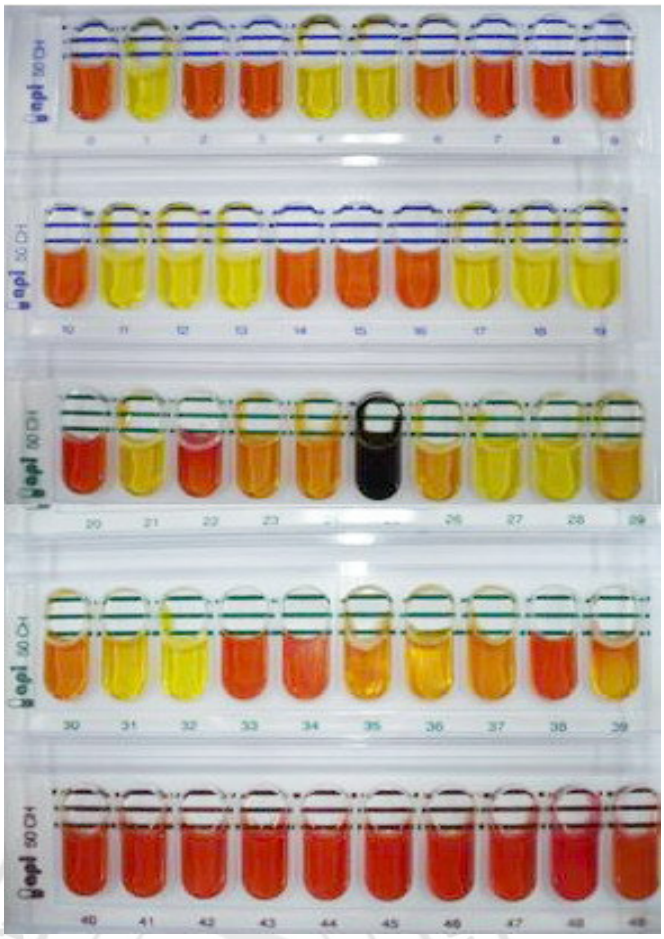
C, central; $+^{s}$, strongly positive; $+^{w}$, weakly positive; $+^{m}$, rapid; V, variable (MacFaddin, 2000)

หมายเหตุ: [a] Differrential characteristics of the most frequently isolated *Bacillus* spp.

[b] ความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาล

6.3 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย โดยใช้ API 50 CHB/E kits (bioMérieux)

คัดเลือกแบคทีเรียจากข้อ 6.2 มา 3 ไอโซเลท เป็นตัวแทนจากแหล่งที่มาทั้งสามแหล่ง คือ TN79 จากถั่วเน่า RS5 จากดินบริเวณรากพืชสมุนไพร และ CMU2 จากผิวของผลลำไย จากการทดสอบคาร์โบไฮเดรตจำนวนทั้งหมด 49 ชนิดโดยใช้ API 50 carbohydrate fermentation strips หลังจากการบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ 17 ชนิด คือ glycerol, L-arabinose, D-ribose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, inositol, D-manitol, D-sorbitol, methyl-αD-glucopyranoside, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-melibiose, D-sacharose (sucrose) และ D-trehalose (ตารางที่ 6.2) แบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ 19 ชนิดคือ glycerol, L-arabinose, D-ribose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, inositol, D-manitol, D-sorbitol, methyl-αD-glucopyranoside, amygdalin, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose (bovine origin), D-sacharose (sucrose) และ D-trehalose (ตารางที่ 6.2) และแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ 23 ชนิด คือ glycerol, L-arabinose, D-ribose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, inositol, D-manitol, D-sorbitol, methyl-αD-glucopyranoside, amygdalin, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose (bovine origin), D-melibiose, D-sacharose (sucrose), D-trehalose, D-raffinose, amidon (starch) และ Glycogen (ตารางที่ 6.2) เมื่อนำผลการทดสอบที่ได้ที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่า API scores ของเชื้อ *Bacillus* สปีชีส์ต่าง ๆ ใน apiweb (https://apiweb.biomerieux.com) พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 มีแนวโน้มที่จะจัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ *B. subtilis* / *B. amyloliquefaciens* เท่ากับร้อยละ 99.5, 99.7 และ 99.2 ตามลำดับ



ภาพที่ 6.3 การทดสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TN79โดยใช้ API 50 CHB/E kits (bioMérieux, France) อ่านผลที่ได้จากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ โดยเมื่อมีการใช้คาร์โบไฮเดรตจะทำให้อาหารมีค่าเป็นกรดและเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ phenol red จากสีแดงเป็นสีเหลือง ยกเว้นการทดสอบ esculin ในหลอดที่ 25 ผลบวกคือจะเปลี่ยนสีของอาหารจากสีแดงเป็นสีดำ

ตารางที่ 6.2 ผลการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TN79, RS5 และ CMU2 โดยใช้ API 50 CHB/E kits (bioMérieux)

strips No.	carbohydrate	*Bacillus subtilis* /*B.amyloliquefaciens*	*B. licheniformis*	TN79	RS5	CMU2	strips No.	carbohydrate	*Bacillus subtilis* /*B.amyloliquefaciens*	*B. licheniformis*	TN79	RS5	CMU2
0	0	0	0	-	-	-	25	ESC	100	100	+	+	+
1	GLY	77	90	+	+	+	26	SAL	86	99	+	+	+
2	ERY	0	1	-	-	-	27	CEL	97	99	+	+	+
3	DARA	0	1	-	-	-	28	MAL	98	100	+	+	+
4	LARA	84	99	+	+	+	29	LAC	23	44	-	+	+
5	RIB	91	97	+	+	+	30	MEL	48	26	+	-	+
6	DXYL	56	97	-	-	-	31	SAC	90	99	+	+	+
7	LXYL	0	1	-	-	-	32	TRE	88	99	+	+	+
8	ADO	0	1	-	-	-	33	INU	58	50	-	-	-
9	MDX	0	1	-	-	-	34	MLZ	0	1	-	-	-
10	GAL	12	75	-	-	-	35	RAF	62	44	-	-	+
11	GLU	95	100	+	+	+	36	AMD	78	99	-	-	+
12	FRU	98	100	+	+	+	37	GLYG	79	87	-	-	+
13	MNE	87	99	+	+	+	38	XLT	1	1	-	-	-
14	SBE	1	8	-	-	-	39	GEN	52	60	-	-	-
15	RHA	1	32	-	-	-	40	TUR	50	78	-	-	-
16	DUL	1	1	-	-	-	41	LYX	0	1	-	-	-
17	INO	65	69	+	+	+	42	TAG	0	91	-	-	-
18	MAN	95	99	+	+	+	43	DFUC	1	1	-	-	-
19	SOR	86	92	+	+	+	44	LFUC	1	1	-	-	-
20	MDM	0	1	-	-	-	45	DARL	1	1	-	-	-
21	MDG	83	99	+	+	+	46	LARL	0	1	-	-	-
22	NAG	29	62	-	-	-	47	GNT	7	39	-	-	-
23	AMY	70	99	-	+	+	48	2KG	0	0	-	-	-
24	ARB	80	99	-	+	+	49	5KG	0	0	-	-	-

+, positive; -, negative

หมายเหตุ GLY = Glyceral, ERY = Erythritol, DARA = D-Arabinose, LARA = L-Arabinose, RIB = D-Ribose, DXYL = D-Xylose, LXYL = L-Xylose, ADO = D-Adonitol, MDX = Methyl-βD-

Xylopyranoside, GAL = D-Galactose, GLU = D-Glucose, FRU = D-Fructose, MNE = D-Manose, SBE = L-Sorbose, RHA = L-Rhamnose, DUL = Dulcitol, INO = Inositol, MAN = D-Manitol, SOR = D-Sorbitol, MDM = Methyl-αD-Mannopyranoside, MDG = Methyl-αD-Glucopyranoside, NAG = N-Acetylglucosamine, AMY = Amygdaline, ARB = Arbutine, ESC = Esculine ferric citrate, SAL = Salicin, CEL = D-Cellubiose, MAL = D-Maltose, LAC = D-Lactose (bovine origin), MEL = Melibiose, SAC = D-Saccharose (sucrose), TRE = D-Trehalose, INU = Inulin, MLZ = D-Melezitose, RAF = D-Raffinose, AMD = Amidon (starch), GLYG = Glycogen, XLT= Xylitol, GEN = Gentiobiose, TUR = D-Turanose, LYX = D-Lyxose, TAG = D-Tagatose, DFUC = D-Fucose, LFUC = L-Fucose, DARL = D-Arabitol, LARL = L-arabitol, GNT = Potassium gluconate, 2KG = Potassium 2-ketogluconate, 5KG = Potassium 5-ketogluconate

6.4 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย โดยใช้ 16S rRNA gene sequence

เมื่อนำผลที่ได้จากการหาลำดับของ 16S rRNA genes ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 มาเปรียบเทียบกับ 16S rRNA genes ในฐานข้อมูลของ GenBank และ EMBL โดยใช้เทคนิค BLAST search (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่าลำดับของ 16S rRNA genes ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ถึงร้อยละ 99.90 (ตารางที่ 6.3) เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 มีความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ถึงร้อยละ 96.17 (ตารางที่ 6.4) เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 มีความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ถึงร้อยละ 99.6 (ตารางที่ 6.5)

ผลที่ได้จากการทำ phylogenetic tree พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 ยังอยู่ในสายที่ห่างจากแบคทีเรียในสปีชีส์ *B. amyloliquefaciens* และ *B. Subtilis* ซึ่งการบ่งชี้ว่าเป็นแบคทีเรียในสปีชีส์ใดนั้นจะต้องมีความเหมือนของ genes ใน sequence นั้นกับข้อมูลในฐานข้อมูล ถึงร้อยละ 97 - 100 จึงจะยอมรับได้ ดังนั้นหากดูจาก phylogenetic tree อาจบ่งชี้ได้ว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่มีข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่นำมาใช้เปรียบเทียบ

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย TN79, RS5 และ CMU2 ได้จัดส่งเข้าฐานข้อมูล NCBI โดยมี accession number ดังนี้ EU590118, EU590117 และ EU590116 ตามลำดับ (ภาคผนวก จ)

ตารางที่ 6.3 ผลการเปรียบเทียบ 16S rRNA genesของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค BLAST search

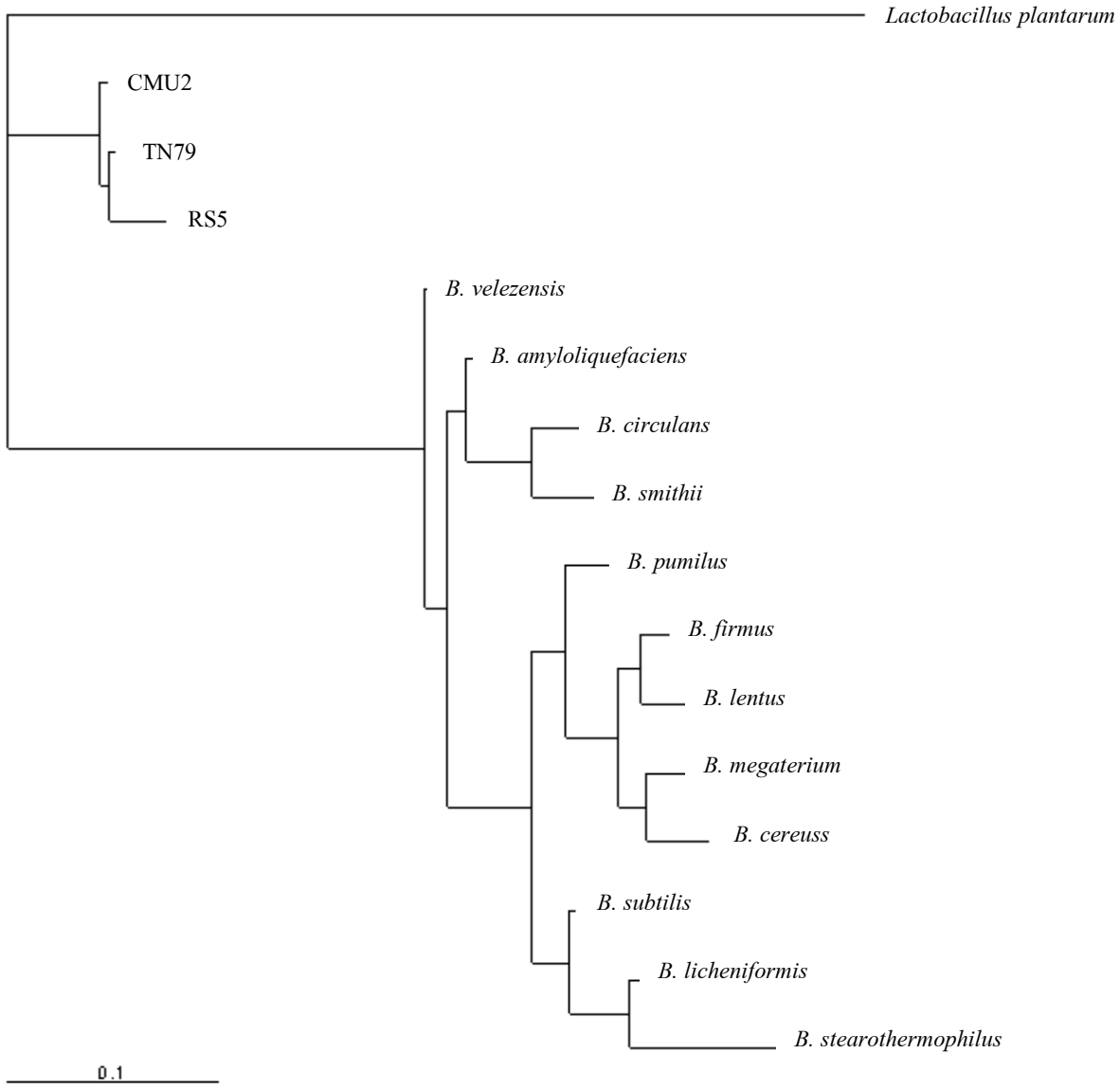
Accession	Description	% similarlity
AB244461.1	*Bacillus* sp. C5-1 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:C5-1	99.90
CP000560.1	*B. amyloliquefaciens* FZB42, complete genome	99.90
EF428253.2	*B. subtilis* strain HDYM-34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.90
EF428251.2	*B. subtilis* strain HDYM-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.90
EF428240.2	*B. subtilis* strain HDYM-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.90
EF428238.2	*B. subtilis* strain HDYM-08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.90
AB300817.1	*B. amyloliquefaciens* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Y13	99.90
AB300802.1	*B. subtilis* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NDN1	99.90
EF581127.1	*B. subtilis* strain h-g 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.90
EF528285.1	*B. subtilis* strain CICCHLJ Q70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.90

ตารางที่ 6.4 ผลการเปรียบเทียบ 16S rRNA genesของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค BLAST search

Accession	Description	% similarlity
AY462214.1	*Bacillus* sp. DF49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.18
DQ422953.1	*B. amyloliquefaciens* strain Ba-74501 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.00
DQ415893.2	*B. subtilis* strain MA139 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.00
EF472266.1	*B. subtilis* strain LQ20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95.90
EF472262.1	*B. subtilis* strain QD434 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.17
EF472261.1	*B. subtilis* strain QD517 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95.90
EF445123.1	*B. subtilis* strain 261 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.17
AB244461.1	*Bacillus* sp. C5-1 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:C5-1	96.00

ตารางที่ 6.5 ผลการเปรียบเทียบ 16S rRNA genesของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค BLAST search

Accession	Description	% similarlity
AB301017.1	*B. amyloliquefaciens* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: GH14	99.40
DQ659146.1	*B. subtilis* strain GR011 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.40
DQ422953.1	*B. amyloliquefaciens* strain Ba-74501 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.50
AB301006.1	*B. amyloliquefaciens* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: GH31	99.30
AB301002.1	*B. amyloliquefaciens* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: GH28	99.30
AB300805.1	*B. amyloliquefaciens* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: R9	99.30
EF488979.1	*B. subtilis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.60
EF492885.1	*B. subtilis* strain B3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.30
EF472266.1	*B. subtilis* strain LQ20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.30
EF472261.1	*B. subtilis* strain QD517 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.60
EF445124.1	*B. subtilis* strain 361 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.60
DQ523502.1	*B. subtilis* strain B432 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.30
DQ520955.1	*B. subtilis* strain B-FS01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.30



ภาพที่ 6.4 phylogenetic tree แสดงผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของ 16S rRNA genes ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 กับ 16S rRNA genes database (บาร์หมายถึง 0.1 nucleotide)

6.5 อภิปรายผล

การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียในที่นี้จะหมายถึงการเทียบเคียงคุณลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรีย กับหมวดหมู่ที่มีการจัดจำแนกไว้แล้ว เช่น Bergey's Manual of Determinative Bacteriology และ MacFaddin โดยในทางปฏิบัติ จะต้องแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจึงตรวจสอบคุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา เช่นรูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ คุณสมบัติการติดสีแกรม สีของรงควัตถุ ลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในเบื้องต้น จากนั้นก็ทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี เช่นความสามารถในการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสามารถใช้จัดจำแนกได้แบคทีเรียในเบื้องต้นได้ดีพอสมควรและมีการทำชุดทดสอบสำเร็จรูปที่สร้างมาเพื่อทดสอบใช้คาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียโดยเฉพาะเช่น API 50 CHB/E kits (bioMérieux) การสร้างเอนไซม์บางชนิด การใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ ความต้องการอาหาร ทดสอบคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เช่น ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่อุณหภูมิสูง หรือ ต่ำมาก คุณสมบัติในการเป็นแอนติเจน ซึ่งคุณสมบัติดังที่กล่าวมาแล้วนี้ ควรจะเทียบเคียงกับข้อมูลอ้างอิงจากหลาย ๆ แหล่งที่มาเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องที่สุด นอกจากนี้แล้วยังมีคุณสมบัติทางด้านพันธุกรรมของแบคทีเรียที่มีการศึกษา และสามารถนำมาใช้จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้อีกด้วย โดยเป็นการจัดจำแนกที่ให้ผลสมบูรณ์ที่สุด โดยเดิมทีจะมีการศึกษาปริมาณของกรดนิวคลิอิกโดยหาปริมาณของ guanine และ cytocine ในเซลล์ หรือหาความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาระหว่าง DNA กับ DNA หรือ DNA กับ RNA ของแบคทีเรียต่างชนิดกัน ในการเกิด DNA hybridization หรือ DNA - RNA hybridization (ดวงพร คันธโชติ, 2537) ในปัจจุบันนี้ยังมีวิธีการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ ลำดับของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียที่แยกได้มาเทียบกับฐานข้อมูลที่มีผู้จัดทำไว้ (www.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez หรือ http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp) เนื่องจาก16S rRNA gene เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับโมเลกุลไรโบโซม ซึ่งไรโบโซมเป็นสิ่งที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และการเรียงตัวของ 16S rRNA gene นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแบคทีเรียแต่ละชนิด เป็นเหมือน signature gene ซึ่งมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด และการจัดเรียงตัวของลำดับเบสบน 16S rRNA gene เป็นที่ทราบกันพอสมควร จึงง่ายต่อการทำ PCR และ nucleotide sequence analysis ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่อยู่ในข่ายยากที่จะจัดจำแนกได้ และยังสามารถนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ในแง่พันธุกรรมของแบคทีเรียได้โดยใช้ phylogenetic system ได้อีกด้วย

จากผลตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียตัวแทนที่คัดมาทั้งหมดเก้าไอโซเลท พบว่าแทบจะไม่มีความแตกต่างกันทางกายภาพและทางชีวเคมี จาก

ตารางของ MacFaddin สามารถบ่งชี้ได้ว่าเป็นแบคทีเรียในตระกูล *Bacillus* และมีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. licheniformis* (MacFaddin, 2000) มากที่สุด อย่างไรก็ตาม การศึกษาลักษณะเบื้องต้นเช่นลักษณะของโคโลนีและการจัดเรียงตัวของเซลล์ใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ระบุว่า *B. subtilis* การจัดเรียงตัวของเซลล์ไม่เป็นเส้นสาย และโคโลนีไม่เป็นเมือก ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* การจัดเรียงตัวของเซลล์จะเป็นเส้นสายและโคโลนีจะมีการสร้างเมือก จากผลการทดลองแบคทีเรียส่วนใหญ่กลับสร้างเมือก และการจัดเรียงตัวของเซลล์ไม่เป็นเส้นสาย (ภาพที่ 6.1) แม้ว่าแบคทีเรียบางชนิดอาจสามารถระบุชนิดได้โดยการดูจากลักษณะของโคโลนี แต่ในกรณีของแบคทีเรียตระกูล *Bacillus* เช่น *B. pumilus* มีรายงานว่าลักษณะของโคโลนีมีการเปลี่ยนแปลงเพียงแค่มีการ subculture เท่านั้น นอกจากนี้ผลการทดสอบทางชีวเคมีในห้องปฏิบัติการยังให้ผลลัพธ์ที่ใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเป็น *B. subtilis* หรือ *B. licheniformis* เนื่องจาก *B. subtilis* และ *B. licheniformis* จัดว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกันซึ่งในตารางการจัดจำแนกในหนังสือหลาย ๆ เล่มใช้การเจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจนเป็นบ่งชี้ความแตกต่างของแบคทีเรียสองชนิดนี้โดยระบุว่า *B. subtilis* ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่ *B. licheniformis* สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า *B. subtilis* ก็สามารถเปลี่ยนให้ตัวเองเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจนได้โดยใช้ nitrate หรือ nitrile มาเป็น terminal electron accepter หรือโดยการ fermentation เมื่อในอาหารมีน้ำตาล glucose (Nagona and Zuber, 1998) ดังนั้นจึงยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดในการทดสอบขั้นแรกว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใดระหว่าง *B. subtilis* และ *B. licheniformis*

เพื่อให้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อที่คัดเลือกมาเป็นแบคทีเรียชนิดใดจึงได้คัดเลือกเชื้อตัวแทนที่มีความแข็งแรงและยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดสามไอโซเลทคือ TN79, RS5 และ CMU2 มาทดสอบยืนยันด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB/E kits (bioMérieux) ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด จากการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียในสปีชีส์ *B. subtilis* / *B. amyloliquefaciens* โดยที่การทดสอบทางชีวเคมีโดยใช้ API 50 CHB/E kits (bioMérieux) นั้นจะไม่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* ออกจากกันได้ นอกจากนี้การใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB/E kits (bioMérieux) ยังเป็นการทดสอบโดยใช้สถิติของการเกิดผลบวกของเชื้ออ้างอิงจากการทดสอบหนึ่งร้อยครั้งแล้วคิดเป็นร้อยละผลการทดสอบออกมา ดังนั้นจำนวนซ้ำของการทดลองจึงมีความสำคัญต่อการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วย การทดสอบซ้ำตั้งแต่ห้าครั้งขึ้นไปจะทำให้มีความแม่นยำมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียบางชนิดก็ไม่สามารถ identify ได้ด้วยการใช้ชุดทดสอบนี้ (Boyd *et al*., 2005; Ngo *et al*., 2000)

การทดสอบทางด้านพันธุกรรมจึงเป็นการทดสอบที่นำมาใช้เพื่อให้มีความแม่นยำสูงขึ้น ผลจากการเทียบเคียง16S rRNA genes ที่ได้ของแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทกับโปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับของ 16S rRNA genes ของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทมีความใกล้เคียงที่สุดกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* จากการทดสอบจะเห็นว่าผลการ BLAST สามารถใช้ยืนยันผลการทดสอบด้วย API 50 CHB/E kits (bioMérieux) ได้ กล่าวคือแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีความใกล้เคียงมากที่สุดกับแบคทีเรียในสปีชีส์ *B. subtilis* / *B. amyloliquefaciens* โดยผลจากการ BLAST นั้นให้ผลออกมาเท่ากับร้อยละ 99.90 และ ผลของการทดสอบด้วย API 50 CHB/E kits (bioMérieux) ให้ผลออกมาเท่ากับร้อยละ 99.5 แต่อย่างไรก็ตามถ้ายังไม่สามารถระบุชนิดได้ชัดเจน ควรดูจาก full rRNA sequence (Barbosa *et al*., 2005) ในแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีการเทียบกับ *B. amyloliquefaciens* FZB42, complete genome ด้วย ซึ่งอาจช่วยยืนยันว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีความใกล้เคียงกับ *B. amyloliquefaciens* มากที่สุด ส่วนแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 และ CMU2 นั้น เมื่อดูจากผลการ BLAST จะเห็นได้ว่ามีความใกล้เคียงกับ *B. subtilis* มากกว่า *B. amyloliquefaciens* นอกจากนี้การทำ phylogenetic tree ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียได้ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 ไม่ได้มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียใน Genus *Bacillus* แต่อย่างใด ซึ่งผลที่แตกต่างกับผลการทดสอบด้วย API 50 CHB/E kits (bioMérieux) และ BLAST search อาจจะเกิดจากความผิดพลาดในระหว่างการทำ phylogenetic tree ก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามผลการทดสอบโดยใช้ API 50 CHB/E kits (bioMérieux) และ BLAST search ก็เพียงพอที่จะยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 แล้ว หากต้องการทดสอบเพิ่มเติมก็ยังสามารถทำได้ เช่น การเปรียบเทียบ full rRNA sequence gene การทดสอบ multiple morphological โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนตรวจดูรูปร่างของเซลล์ endospore หรือ flagella และการทดสอบ physiology parameter เช่น การเจริญใน alkaline condition การเกิด hemolysis บน 5% Blood agar การสร้าง pigment เพื่อยืนยันการการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

บทที่ 7

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติจำนวน 284 ไอโซเลทเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* CMUL ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่แยกได้จากผิวเปลือกของผลลำไย โดยสามารถแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ทั้งหมดจำนวน 43 ไอโซเลท และคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์มาทำการทดสอบต่อ 3 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN 79 จากถั่วเน่า แบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 จากดินบริเวณรากพืชสมุนไพร และ แบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 จากผิวของผลลำไย ในขั้นต้นพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสามไอโซเลทสามารถควบคุมเชื้อราก่อโรคได้ดีในห้องปฏิบัติการในกรณีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตเพาะเลี้ยงกับเชื้อราก่อโรคโดยตรง เชื้อแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทมีคุณสมบัติของการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์คือมีการเจริญอย่างรวดเร็วสามารถแข่งขันกับเชื้อก่อโรคได้ดีซึ่งเป็นกลไกหลักในการควบคุมโรคโดยชีววิธี มีความทนทานต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างได้ในช่วงกว้าง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้หลายสายพันธุ์ แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรากลับพบปัญหาว่าไม่สามารถสกัดสารยับยั้งเชื้อราออกมาได้ ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากความเข้มข้นของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียมีน้อยเกินไปจนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นการสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราจึงต้องทำการสกัดจากเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งแทน ซึ่งสารสกัดหยาบที่สกัดโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 สามารถทำให้เส้นใยของเชื้อราหยุดชะงักการเจริญได้ มีความทนทานต่อ แสงยูวี เอนไซม์ย่อยโปรตีน ความร้อน และ ค่าความเป็นกรดด่างในระดับต่างๆกันได้ดีพอสมควร แต่เมื่อเทียบกับการใช้ตัวเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรียปฏิปักษ์แล้วประสิทธิภาพการยับยั้งโดยการใช้เชื้อแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตจะมีประสิทธิภาพสูงกว่า นอกจากนี้การสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งยังทำได้ยากและให้ปริมาณสารสกัดค่อนข้างน้อย และจากการวิเคราะห์สารสกัดจากแบคทีเรียด้วยเทคนิค GC-MS ยังไม่สามารถระบุได้แน่นอนว่าสารประกอบใดเป็นสารประกอบหลักที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา เนื่องจากเป็นสารสกัดหยาบมี

ปริมาณสารประกอบในแต่ละสารสกัดมากกว่าห้าสิบชนิด และมีปริมาณน้อย หากต้องการศึกษาต่อไปอาจต้องสกัดสารให้มีปริมาณมากขึ้นและทำให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยการนำไประเหยเอาน้ำออกและแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ในขั้นแรกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีและ ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีแล้วจึงนำสารบริสุทธิ์แต่ละชนิดกลับมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งการทดสอบมีซับซ้อนมากขึ้นจึงไม่สามารถทำให้สมบูรณ์ได้ในงานวิจัยนี้

เมื่อพิจารณาจากผลการพิสูจน์ชนิดของแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทพบว่ามีความใกล้เคียงกับ เชื้อแบคทีเรียในสปีชีส์ *Bacillus subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* มากที่สุด โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* นั้นเป็นแบคทีเรียที่ได้ชื่อว่ามีประสิทธิภาพสูงและมีการนำไปใช้ควบคุมเชื้อก่อโรคได้จริงในทางปฏิบัติ เช่นมีการนำ *B. subtilis* ใส่ลงในแว๊กซ์ที่เคลือบลูกพีชเพื่อป้องกันโรค brown rot ที่เกิดจากเชื้อ *Monilinia fructicola* (Pusey *et al*., 1998) ได้ จากการทดลองจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียไอโซเลท ที่ TN79, RS5 และ CMU2 นั้นเหมาะที่จะใช้เซลล์ของแบคทีเรียโดยตรงในการควบคุมเชื้อโรคหลังการเก็บเกี่ยว น่าจะมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารสกัดจากแบคทีเรีย เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสูงกว่า สามารถนำไปผลิตหรือนำไปประยุกต์ใช้เช่นผสมลงในแว๊กซ์ที่เคลือบผลไม้ได้ มีความทนทานสูง และอาจจะมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าการใช้สารสกัด แต่อย่างไรก็ตาม การคัดเลือกที่เรียกได้ว่าประสบผลสำเร็จจะขึ้นอยู่กับขีดความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์นั้นๆ เช่นความสามารถที่จะอยู่รอดของแบคทีเรียและความสามารถอดทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ง่ายในธรรมชาติ การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในบริเวณบาดแผลของผลไม้ต้องมีปริมาณมากพอที่จะก่อให้เกิดประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคโดยเชื้อก่อโรคหลายๆชนิดที่ก่อให้เกิดโรคโรคเดียวได้ด้วย และนอกจากนี้ควรจะมีขีดความสามารถและมีความไวมากกว่าการใช้สารเคมีในปัจจุบัน พร้อมทั้งคำนึงถึงความปลอดภัยของการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีชีวิตที่อาจมีผลกระทบต่อเกษตรกร ผู้บริโภค รวมถึงสิ่งแวดล้อมทั้งในระยะสั้นและระยะยาว ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่อาจเกิดขึ้นจากแบคทีเรียปฏิปักษ์รวมถึงเทคโนโลยีการผลิตให้ถูกต้องด้วย ดังนั้น เชื้อแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทที่แยกมาได้จึงต้องทำการศึกษาพัฒนาต่อไปในด้านต่างๆ เช่น ความปลอดภัยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคโดยตรงในสภาพสวนผลไม้ หรือ การควบคุมหลังการเก็บเกี่ยวในระยะขนส่งและการเก็บรักษา การประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีควบคุมโรคอื่นๆ รวมถึงการรักษาคุณภาพและอายุการใช้งานของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในระยะยาวด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. กรมส่งเสริมการเกษตร. ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร. [ออนไลน์] 2549 [24/05/2551]. แหล่งที่มา. http://www.doae.go.th/indexhome.asp
2. กัลยา วิธี. ผลของสารประกอบคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนตต่อคุณภาพและการควบคุมเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. บนลำไยหลังการเก็บเกี่ยว. [วิทยานิพนธ์] เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2540.
3. ดนัย บุญเกียรติ. โรคหลังเก็บเกี่ยวของผักและผลไม้. ใน: ประสาทพร สมิตมาน เรียบเรียง. โรคพืชวิทยา. เชียงใหม่: ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2534. น. 284-292.
4. ดวงพร คันธโชติ. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. ; 2537.
5. ทัศนวรรณ ศรีวะอุไร, นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง, สมศิริ แสงโชติ, ชลิดา เล็กสมบูรณ์, จริงแท้ ศิริพานิช และ อุดม ฟ้ารุ่งสาง. การยับยั้งรา *Lasiodiplodia theobromae* สาเหตุโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะ โดยจุลินทรีย์ที่ได้จากทรงพุ่ม. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 42 สาขาพืช: 3-6 กุมภาพันธ์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2547.
6. ประพันธ์ โอสถาพันธุ์, ชาญณรงค์ ดวงสะอาด, วรวรรณ ชาลีพรหม และ ศมาพร แสงยศ. การควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวของลำไยและลิ้นจี่โดยชีววิธี: รายงานผลงานวิชาการประจำปี ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติภาคเหนือ. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้; 2544.
7. พรพิมล อธิปัญญาคม, ลักษณ์ วงศ์หิรัญภิญโญ, พัฒน์พงค์ ภัทรโกศล และ ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุ และความรุนแรงของโรคลำไย. กรุงเทพฯ: กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช; 2546.
8. พิภพ ลำยอง. หลักการป้องกันกำจัดโรคพืช. ใน: ประสาทพร สมิตมาน เรียบเรียง. โรคพืชวิทยา. เชียงใหม่: ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2534. น. 314-337.
9. วรุณรักษ์ รายินวล. การควบคุมการเน่าเสียของผลลำไย (*Dimocarpus Longan* Lour spp. *Longan* var. *longan*) หลังการเก็บเกี่ยวด้วยสารอะเซทัลดีไฮด์. [วิทยานิพนธ์] เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2539.

10. สุจิรา รวมเงาะ. การควบคุมโรคผลเน่าของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gleosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae* และ *Phomopsis* sp. หลังการเก็บเกี่ยว. [วิทยานิพนธ์] กรุงเทพ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2543.
11. สมศิริ แสงโชติ, รัติยา พงศ์พิสุทธา และ รณภพ บรรเจิดเชิดชู. โรคที่เกิดกับผลทุเรียนหลังการเก็บเกี่ยว. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 สาขาพืช ประมง. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2539.
12. สมศิริ แสงโชติ, รัติยา พงศ์พิสุทธา และ รัตนา อเนกธนโชติ. การเปลี่ยนแปลงของเชื้อ ความมีชีวิต แหล่งของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของทุเรียนและการควบคุม. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาพืชและสาขาส่งเสริมนิเทศศาสตร์เกษตร. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2543.
13. สมศิริ แสงโชติ และ สุมิตรา แสงวนิชย์. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคขั้วหวีเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* บนกล้วยหอมทอง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 สาขาพืช. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2548.
14. สุมิตรา แสงวนิชย์. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคขั้วหวีเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffs & Maubl. บนกล้วยหอมทอง. [วิทยานิพนธ์] กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2547.
15. อุดม ฟ้ารุ่งสาง นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง ทัศวรรณ ศรีวะอุไร และ สมศิริ แสงโชติ. การสำรวจและการคัดเลือกยีสต์จากธรรมชาติที่ต่อต้านรา *Lasiodiplodia theobromae* สาเหตุโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะ. เชียงใหม่: Postharvest Newsletter; 2548. น. 4.
16. อุราภรณ์ สอาดสุด วิชชา สอาดสุด และโสภณ สิงห์แก้ว. การประเมินความเสียหายในมะม่วง พันธุ์น้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยว : รายงานวิชาการ. เชียงใหม่: สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2546.
17. วิโรจน์ สุนทรภัค, ประพนธ์ ไทยวานิช และ ศุภลักษณ์ กลับน่วม. สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร. [ออนไลน์] 2551 [24/05/2551]. แหล่งที่มา. http://agriqua.doae.go.th
18. สารสนเทศอารักขาพืช “โรคฝรั่ง”. โรคผลเน่า. [ออนไลน์] 2551 [24/05/2551]. แหล่งที่มา. http://www.doa.go.th
19. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. สถิตินำเข้าและส่งออก. [ออนไลน์] 2551 [24/05/2551]. แหล่งที่มา. http://www.oae.go.th/oae_website/

20. Aghighi, S., Shahidi-Bonjar, G. H. and Saadoun, I. First report of antifungal properties of a new strain of *Streptomyces plicatus* (strain101) against four Iranian phytopathogenic isolates of *Verticilium dahliae*, a new horizon in biocontrol agents. Biotechnology. 2004;3:90-97.
21. Agrios, G. N. Plant pathology 5th ed. San Diego: Elsevier academic;2005.
22. Anthony, S., Abeywickrama, K., Dayananda, R., Wigeratnam, S. W. and Arambewela, L. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka, and their treatment with essential oils. Mycopathologia. 2004;157:91-97.
23. Alves, A., Crous, P. W., Correia, A. and Phillips, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Divers. 2008;28:1-13.
24. Alvindia, D. G., Kobayashi, T., Natsuaaki, K. T. and Tanda, S. Inhibitory influence of inorganic salts on banana postharvest pathogens and preliminary application to control crown rot. J Gen Plant Pathol. 2004;70:61-65.
25. Appel, D. J., Gees, R. and Coffey, M. D. Biological control of postharvest pathogen *Penicillium digitatum* on Eueka lemons. Phytopathology. 1988;78:1593.
26. Arras, G. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. Postharvest Biol Technol. 1996;8:191-198.
27. Avis, T. J. and Bélanger, R. R. Specificity and mode of action of the antifungal fatty Acid cis-9-Heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. Appl Environ Microbiol. 2001;67:56-60.
28. Baird, R. E. Deuteromycota: the imperfect fungi. In: Robert N., Windham, M. T., Alan S.; Editors. Plant pathology concepts and laboratory exercise. New York: CRC Press; 2004. p. 133-139.
29. Baker, K. J. and Cook, R. J. Biological Control of Plant Pathogens. San Francisco; California: W. H. Freeman and Co.; 1974.
30. Barbosa, T. M., Serra, C. R., Ragione, M. L. R., Woodward, M. J. and Henriques, A. O. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. Appl Environ Microbiol. 2005;71:968-978.
31. Barkai-Golan, R. Postharvest diseases of fruits and vegetables development and control. London: Elsevier Science; 2001.

32. Barnette, H. L. and Hunter, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. New York: Macmillan; 1987.

33. Baron, E. J. and Finegold, S. M. Methods for testing antimicrobial effectiveness. In: Bailey and Scott's Diagnosis Microbiology. 3rd ed. St. Louis: Mosby; 1990. p. 171-194.

34. Basha, S. and Ulaganathan, K. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. Curr Sci India. 2002;82:1457-1462.

35. Bellows T. S. Foliar, flower, and fruit pathogens. In: Bellows T.S.; Editor. Handbook of biological control: principles and applications of biological control. San Diego: TWFisher; 1999. p. 841-870.

36. Berk, M .J. and Curtis, M. A. Geological and natural history survey of North Carolina. part III: botany, containing a catalogue of the indigenous and naturalized plants of the State. n.p.; 1867. p. 148.

37. Bhuvaneswari, V. and Rao, M. S. Evaluation of *Trichoderma viride* antagonistic to postharvest pathogens on mango. Indian Phytopath. 2001;54:493-494.

38. Boudreu, M.A. and Andrew, J.H. Factors influencing antagonism of *Chetomium globosum* to *Venturea inaequalis*: a case study in fail biocontrol. Phytopathology. 1987;77:1470-1475.

39. Boyd, M. A., Antonio, M. A. D. and Hillier, S. L. Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. J Clin Microbiol. 2005; 43:5309-5311.

40. Brown, G. E., Davis, C. and Chambers, M. 2000. Control of citrus green mold with aspire is impacted by the type of injury. Postharvest Biol Tec. 18, 57 - 65.

41. Bryk, H., Dyki, B. and Sobiczewski, P. Antagonistic effect of *Erwinia herbicola* on in vitro spore germination and germ tube elongation of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. Biocontrol. 1998;43:97-106.

42. Bull, C. T., Stack, J. P. and Smilanick, J. L. *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. Biol Control. 1997;8:81-88.

43. Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., Caputo, L., Pacifico, S. and De Cicco, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. Postharvest Biol Technol. 2001;22:7-17.

44. Cedeño, L., Mohali, S., and Palacios-Prü, E. Ultrastructure of *Lasiodiplodia theobromae* casual agent of caribbean pine blue stain in venezuel. Interciencia. 1996;21:264-265.

45. Chalutz, E., Ben-Arie, R., Droby, S., Cohen, L., Weiss, B. and Wilson, C.L. Yeast as biocontrol agents of postharvest diseases of fruits. Phytoparasitica. 1988;16:69.

46. Chalutz. E. and Wilson, C. L. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debryomyces hansenii*. Plant Dis. 1990;74:134-137.

47. Cilliers, A. J., Swart, W. J. and Wingfield, M. J. A review of *Lasiodiplodia theobromae* with particular reference to its occurrence on coniferous seeds. S AFR For J. 1993;166:47-52.

48. Coste, D. E. de and Subasinghe, S. S. N. S. Antagonistic bacteria associated with the fruit skin of banana in controlling its postharvest diseases. Trop Sci. 1999;38:206-212.

49. Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M .J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Phillips, A. J. L. *et al.*, Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. Stud Mycol. 2006;25:235-253.

50. De Matos, A. P. Chemical and biological factors influencing the infection of lemons by *Geotricum candidum* and *Penicilium digitatum*. [Ph.D. Dissertation]. California: University of California. Riverside; 1983.

51. Dubos, B. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevines by an antagonistic strain of *Trichoderma harzianum.* In: Klub M. J. and Reedy, C. A. Current perspectives in microbial ecology. Washington DC: Am Soc Microbiol; 1984. p. 370-373.

52. Duncan, R. Biological control of *Botrytis cinerea* on kiwifruit through field antagonistic microorganism. [Thesis]. California: California State University; 1991.

53. Droby, S., Chalutz, E. and Wilson, C. L. Antagonistic microorganism as biological control agents of postharvest diseases of fruit and vegetable. Postharvest news and information 1991;2:169-173.

54. Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L. and Winiewski, M. E. Biological control of postharvest disease: a promising alternative to the use of synthetic fungicide. Phytoparasitica. 1992;20:1495-1535.

55. Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., and Bottge E. C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes - characterisation of gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 1998;17:7843-7853.

56. Elad, Y., Chet, I. and Henis, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Can J Microbiol. 1982;28:719-725.

57. El Ghaouth, A., Wilson, C. L. and Wisniewski, M. Control of postharvest decay on apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. Phytopathology. 2003;93:344-348.

58. El-Neshawy, S. and Shetaia, Y. M. H. Biocontrol capability of *Candida* spp. against *Botrytis* rot of strawberries with respect to fruit quality. Acta Horticulturae. 2003: p. 604.

59. Falk, S. P., Pearson, R. C., Gadoury, D. M., Seem, R. C. and Sztejnberg, A. *Fusarium proliferatum* as a biocontrol agent against grape downy mildew. Phytopathology. 1996;86:1010-1017.

60. Filonow, A. B. Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. Biocontrol Sci Technol. 1998;8:243-256.

61. Filonow, A. B. Yeasts reduce the stimulatory effect of acetate esters from apple on the germination of *Botrytis cinerea* conidia. J Chem Ecol. 1999;25:1555-1565.

62. Filonow, A. B. Butyl acetate and yeasts interact in adhesion and germination of *Botrytis cinerea* conidia in vitro and in fungal decay of Golden Delicious apple. J Chem Ecol. 2001. ;27:831-844.

63. Filonow, A. B., Vishniac, H. S., Anderson, J. A. and Janisiewicz, W. J. Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. Biol Control. 1996;7:212-220.

64. Garett, S. D. Toward biological control of soil - borne plant pathogens. In: Baker, K. F. and Snyder W. C.; Editors. Ecology of soil-borne plant pathogens. Los Angeles: University of California Berkeley press; 1965. p. 4-17.

65. Gillespie, L. J. The comparative viable of Pneumococci on solid and on fluid culture media. J Exp Med. 1913;584-590.

66. Gnanamanickam, S. S., Vasudevan, P., Reddy, M. S., Kloepper, J. W. and Défago, G. Principles of biological control. In: Gnanamanickam, S. S.; Editor. Biological control of crop disases. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 1-7.

67. Goodman, R. N. The influence of antibiotics on plants and plant disease control. In: Goldberg, H. S. D.; Editor. Antibiotics: their chemistry and non-medical uses. Princeton: Van Nostrand and Company; 1959. p. 322-448.

68. Gravesse, C., Jijakli, M. H. and Lipoivre, P. Study of the exo-ß-1,3-gluconase activity production by yeast *Pichia anomala* in relation to its antagonistic properities against *Botrytis cinerea* on postharvest apples. Meded Fac Landbouwwet.- Rijksuniv Gent. 1998;63:1682-1685.

69. Gueldner, R. C., Reilly, C. C., Pusey, P. L., Costello, C. E., Arrendale, R. F., *et al*. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. J Agric Food Chem. 1988;36:366-370.

70. Guizzardi, M., Elad, Y. and Mari, M. Treatments against postharvest fruit diseases using Trichodex (*Trichoderma harzianum*). Proceeding of 5th international *Trichoderma*/ Gliocladium workshop. U.S.A: Beltsville; 1995. p. 39.

71. Hamdan, H., Weller, D. M. and Thomashow, L. S. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. Appl Environ Microbiol. 1991;57:3270-3277.

72. Huang, Y., Wild, B. L. and Morris, C. Postharvest biological control of *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *Bacillus pumilus*. Ann Appl Biol. 1992;120:367-372.

73. Heye, C. C. and Andrews, J. H. Antagonism of *Athelia bombacina* and *Chetomium globosum* to the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. Phytopathology. 1983;73:650-654.

74. Holo, H., Faye, T., Brede, D. A., Nilsen, T., øDEGÅRD, I., Langsrud, T. *et al.* Bacteriocins of propionic bacteria. Oslo: EDP Sciences; 2002. p. 59-68.

75. Janisiewicz, W. J. Postharvest biological control of blue mold on apples. Phytopathology. 1987;77:481-485.

76. Janisiewicz W. J. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. Phytopathology. 1988;78:194-198.

77. Janisiewicz, W. J. and Korsten, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. Annu Rev Phytopathol. 2002;40:411-441.

78. Janisiewicz, W. J. and Roitman, J. Postharvest mucor rot control on apple with *Pseudomonas cepacia*. Phytopathology. 1987;77:1776.

79. Janisiewicz, W. J., Tworkoski, T. J. and Sharer, C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. Phytopathology. 2000;90:1196-1200.

80. Jijakli, M. H, and Lepoivre, P. Characterization of an exo-ß-1,3-gluconase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. Phytopathology. 1998;88:335-343.

81. Johnson, L. F., and Curl, E. A. Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens. Minneapolis**:** Burgess; 1972.

82. Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J. and Truant, J. P. Fatty acids derivatives as antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother. 1972;2:23-27.

83. Kapat, A., Zimand, G. and Elad, Y. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. Physiol Mol Plant Pathol. 1998;52:127-137.

84. Kerr A. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. Plant Dis. 1980;64:25-30.

85. Kexiang, G., Xiaoguang, L., Yonghong, L., Tianbo, Z. and Shuliang, W. Potential of *Trichoderma hazainum* and *T. atroviride* to control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*, the cause of apple ring rot. J Phytopathol. 2002;150:271-276.

86. Korsten, L., Bezuidenhaut, J. J. and Kotzé, J. M. Biocontrol of avocado postharvest diseases. SA grower's Assoc. 1989;12:10-12.

87. Korsten, L. and Kotzé, J. M. Postharvest biological control of avocado postharvest diseases. Proceeding of the second world avocado congress, California: California Avocado Society; 1992. p. 473-477.

88. Korsten, L, de Villiers, E. E., de Jager, E. S., van Harmelen, M. W. S. and Heitmann, A. Biological control of litchi fruit diseases. SA Growers' Assoc 1993;5:36-40.

89. Li, H. Y., Cao, R. B. and Mu, Y. T. In vitro of *Botryosphaeria dothida* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. Crop Prot.1995;14:187-191.

90. Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R. and De Cicco, V. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post - harvest rots on different fruits. Biocontrol Sci Technol. 1998;8:257-267.

91. Lorian, V. In vitro simulation of in vivo condition : physical state of the culture medium. J Clin Microbiol. 1989;27:2403-2406.

92. MacFaddin, J. F. Biochemical tests for identification of medical bacteia. 3rd ed. Maryland: Lippincott Willium & Winkins; 2000.

93. Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. Structural characterizaton of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45°C. J Surfactants Deterg. 1999;2:369-372.

94. Marais, L. J. Avocado diseases of major importance worldwide and their management. In: Naqvi, S.A.M.H.; Editor. Diseases of fruits and vegetables diagnosis and management volume II. Dordrecht: Kluwer Academic; 2004. p.14.

95. McLaughlin, R. J., Wisniewski, M. E., Wilson, C. L. and Chalutz, E. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. Phytopathology. 1990;80:456-461.

96. McLaughlin, R. J., Wilson, C. L., Droby, S., Ben-Arie, R. and Chalutz, E. Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with the yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii.* Plant Dis. 1992;76:470-473.

97. Misra, A. K. Guava disease - their symptomp, causes and management. In: Naqvi, S. A. M. H.; Editor. Diseases of fruits and vegetables diagnosis and management volume II. Dordrecht: Kluwer Academic; 2004. p.109.

98. Mortuza, M. G., and Ilag, L. L. Potential for biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maaubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. Biol Control. 1999;15:235-240.

99. Nagano, M. M. and Zuber, P. Anaerobic growth of "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). Annu Rev Microbiol. 1998;52:165-190.

100. Ngo, T. H., Baccigalupi, L., Huxam, A., Smertenko, A., Van, P., Ammendola, S. *et al.* Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. Appl Environ Microbiol. 2000;66:5241-5247.

101. Noveriza, R. and Quimio, T. H. Soil mycoflora of black pepper rhizosphere in The Philippines and their in vitro antagonism against *Phytophthora capsici* L. IJAS. 2004;5:1-10.

102. Nunes, C., Teixidó, N., Usall, J. and Viñas, I. Biological control of major postharvest diseases on pear fruits with antagonistic bacterium Pantoea agglomerans (CPA-2). Acta Horticulturea. 2001;553:403-404.

103. Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A., Gryzenhout, M. and Wingfield, M. J. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum*. S AFR Stud Mycol. 2004;50:313-322.

104. Pantos, O., Cooney, R. P., Barer, Le Tissier, M. D. A., Barer, M. R., O'Donnell, A. G. and Bythell, J. C. The bacterial ecology of a plague-like disease affecting the Carribbean coral *Montastrea annularis*. Environ Microbiol. 2003;5:370-382.

105. Poppe, L., Vanhoulte, S. and Höfte, M. Mode of action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist of postharvest pathogens of fruits. Eur J Plant Pathol. 2003;109:963-973.

106. Pusey, P. L. Antibiosis as mode of action in postharvest biological control. Workshop on biological control of postharvest disease of fruit and vegetable. 1991;184:127-141.

107. Pusey, P. L. and Wilson, C. L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. Plant Dis. 1984;68:753-756.

108. Qi-qin, L., Xiang - ying, M., Xue, W., Wie, L., Cheng-jie, D., Jia-xun, F., *et al*. Purification of two antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* strain B11 and their properties. Agr Sci China. 2006;5:363-369.

109. Raut, S. P. and Ranade, S. Banana and their management. In: Naqvi, S. A. M. H.; Editor. Diseases of fruits and vegetables diagnosis and management volume II. Dordrecht: Kluwer Academic; 2004. p. 44.

110. Roberts, R. G. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. Phytopathology. 1990;80:526-530.

111. Roberts, R. G. Characterization of postharvest biocontrol of deciduous fruit diseases by *Cryptococcus* spp. Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables. Washington D.C.: USDA Publication. ARS-92; 1991. p. 32.

112. Sato, T., Iwamoto, Y. Tomioka, K., Taba, S., Ooshiro, A. and Takaesu, K. Black band of Jew's marrow caused by *Lasiodiplodia theobromae*. J Gen Plant Pathol. 2007;74:91-93.

113. Singh, R. S. Diseases of fruit crops. New Delhi: Science; 2000.

114. Singh,V. and Deverall, B. J. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Trans Br Mycol Soc. 1984;83:487-490.

115. Sivakumar, D., R. S. Wilson Wijeratnam, Wijesundera, R. L. C., Marikar, F. M. T. and Abeyesekere, M. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*). Phytoparasitica. 2000;28:1-6.

116. Sneat, P. H. A. Bergey's manual of systematic bacteriology section 13 volumn 2. Maryland: Lippincotte Williums&Wilkins; 1986. p. 1104-1139.

117. Sobiczewski, P. and Bryk, H. Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on postharvest apples by antagonistic bacteria. Int. Conf. Integrated Fruit Prod. 1996;19:344-345.

118. Srivastava, M. P. and Mehra, R. Diseases of miner tropical and sub - tropical fruits and their management. In: Naqvi, S. A. M. H.; Editor. Diseases of fruits and vegetables diagnosis and management volume II. Dordrecht: Kluwer Academic; 2004. p. 560.

119. Stirling, A. M., Pegg, K. G. and Hayward, A. C. Interaction of *Collectotrichum gloeosporioides*, epiphytic microorganism and nutrients on avocado leaves and fruit. Australasian plant Pathol. 1998;27:169-179.

120. Stevens, N. E. The life history and relationships of *Diplodia gossypina*. Mycologia. 1925;17:191-201.

121. Stevens, N. E. Two species of physalospora on citrus and other hosts. Mycologia. 1926;18:206-217.

122. Stretch, A. W. Biocontrol of blueberry and cranberry fruit rots. Acta Horticulturae. 1989;241:301-305.

123. Stover, R. H. Banana, plantain and abaca disease. London: Eastern Press; 1972.

124. Summerbell, R. C., Krajden, S., Levine, R. and Fuksa, M. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. Med Mycol. 2004;42:543-547.

125. Sutton, B. C. The Coelomycetetes**.** Kew: Common Wealth Mycological Institute; 1980.

126. Swain, M. R. and Ray, R. C. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. Microbiol Res. 2007;162.(in press).

127. Takesako, K., Ikai, K., Haruna, F., Endo, M., Shimanaka, K. *et al*. Aureobasidins, new antifungal antibiotics. Taxonomy, fermentation, isolation, and properties. J Antibiot. 1991;44:919-924.

128. Tronsmo, A. and Raa, J. Antagonist action of *Trichoderma pseudokoningii* against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. Phytopathol Z. 1977;89:216-220.

129. Tronsmo, A. and Ystaas, J. Biological control of *Botrytis cinerea* on apple. Plant dis. 1980;64:1009.

130. Utkhede, R. S. and Sholberg, P. L. In vitro inhibition of plant pathogens by *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* and in vivo control of two postharvest cherry diseases. Can J microbial. 1986;32:963-967.

131. Van Driechce, R. G. and Bellows, T. S. Pesticides and the history of biological control. In: Van Driechce, R. G., Bellow, T. S. and Pest origins, Jr; Editors. Biological control. New York: Chapman and Hall; 1996. p. 3-18.

132. Ventura, J. A., Costa, H. and Tatagiba, J. D. S. Papaya diseases and integrated control. In: Naqvi, S. A. M. H.; Editor. Diseases of fruits and vegetables diagnosis and management volume II. Dordrecht: Kluwer Academic; 2004. p. 229.

133. Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N. and Sanchis, V. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. Int Food Microbiol. 1998;40:9-16.

134. Von Arx, J. A. The genera of fungi sporulating in pure culture. Lehre: J. Cramer; 1970. p. 288.

135. Wilson, C. L. and Chalutz, E. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. Sci Hortic. 1989;40:105-112.

136. Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., Mc - Laughlin, R., Wilson, C. and Chalutz, E. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii* characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. Physiol Mol Plant Pathol. 1991;39:245-258.

137. Wisniewski, M., Wilson, C., Chalutz, E., Hershberger, W. Biological control of postharvest diseases of fruit: inhibition of *Botrytis* rot on apple by an antagonistic yeast. Presented at Annu. Meet. Electron Microsc Soc Am, 46th, San Francisco: Nonprofit Scientific; 1988.

138. Wisniewski, M., Wilson, C. and Hershberger, W. Characterization of inhibition of *Rhizopus stolonifer* germination and growth by *Enterobacter cloacae*. Can J Bot. 1989;67:2317-2323.

139. Wrather, J. A., Kuc, J. and Williams, E. B. Protection of apple and pear fruit tissue against fireblight with nonpathogenic bacteria. Phytopathology. 1943;63:1075-1076.

140. Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., and Bertagnolli, B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil Biol Biochem. 2001;34:955-963.

141. Zahavi, T., Cohen, L., Weiss, B., Schena, L., Daus, A., *et al*. Biological control of *Botrytis, Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. Postharvest Biol Technol. 2000;20:115-124.

142. Zhang, H. Y., Zheng, X. D. and Xi, Y. F. Biocontrol of postharvest blue mold rot of pear by *Cryptococcus laurentii*. J Hortic Sci Biotech. 2003;78:888-893.

143. Zhou, T., Northover, J. and Schneider, K. E. Biological control of postharvest diseases of peach with phyllosphere isolates of *Pseudomonas syringae*. Can J Plant Pathol. 1999;21:375-381.

ภาคผนวก ก

เทคนิคการย้อมสีและการเตรียม Mc Farland standard

การย้อมสปอร์ของแบคทีเรีย

1. นำเชื้อแบคทีเรียมา smear บนแผ่นสไลด์ ปล่อยให้แห้งแล้วนำไปผ่านเปลวไฟ

2. ใส่สีย้อม malachite green ลงบนสไลด์จนท่วมบริเวณที่มีแบคทีเรีย แล้วใช้เปลวไฟอ่อนๆลนเป็นเวลาประมาณห้านาทีโดยระวังไม่ให้สีย้อมแห้ง เติมสีย้อมเมื่อจำเป็นแล้วทิ้งให้เย็น ล้างสีออกด้วยน้ำแล้วซับให้แห้ง นำสไลด์ไปตรวจดูด้วยเลนซ์หัวน้ำมัน สปอร์จะติดสีเขียว ส่วนตัวเซลล์ติดสีแดง

การย้อมแคปซูลของแบคทีเรีย

1. ใช้ห่วงลวดแตะ India – ink หรือ Nigrosin มาหยดลงบนสไลด์แล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียมาผสมใน India – inkที่หยดไว้

2. ปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์อย่าให้มีฟองอากาศกดให้แน่นจนกระทังเห็นเป็นสีน้ำตาลหรือสีม่วงจางๆ ตรวจดูด้วยเลนซ์หัวน้ำมันจะเห็นแคปซูลเป็นบริเวณขาวใสอยู่รอบตัวแบคทีเรีย

การย้อมสีแกรม

1. หยดน้ำสะอาดบนแผ่นสไลด์แล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียมาผสมกับหยดน้ำละเลงให้กระจายออกเป็นบริเวณบางๆ ปล่อยให้แห้งแล้วนำไปผ่านเปลวไฟอ่อนเพื่อทำให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์

2. หยดสีย้อม crystal violet ปล่อยทิ้งไว้ 1 นาทีเทสีออกล้างออกด้วยน้ำก๊อกไหลอ่อนๆ แล้วใส่น้ำยาไอโอดีนนาน 1 นาทีเพื่อช่วยให้สีติดดีขึ้น

3. ใช้น้ำยาล้างสี หรือ แอลกอฮอล์ 95% หยดให้ไหลผ่านสไลด์จนน้ำยาที่หยดผ่านไม่มีสีติดออกมาด้วย ระวังอย่าให้สีออกมากเกินควรเพราะจะทำให้ผลที่ได้ผิดพลาด

4. ล้างด้วยน้ำอย่างรวดเร็ว สลัดน้ำออกจากสไลด์ให้หมด

5. ย้อมด้วยสีย้อมควบคู่ safranin o นานครึ่งถึง 1 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำเปล่า ซับน้ำออกและปล่อยให้สไลด์แห้งสนิท

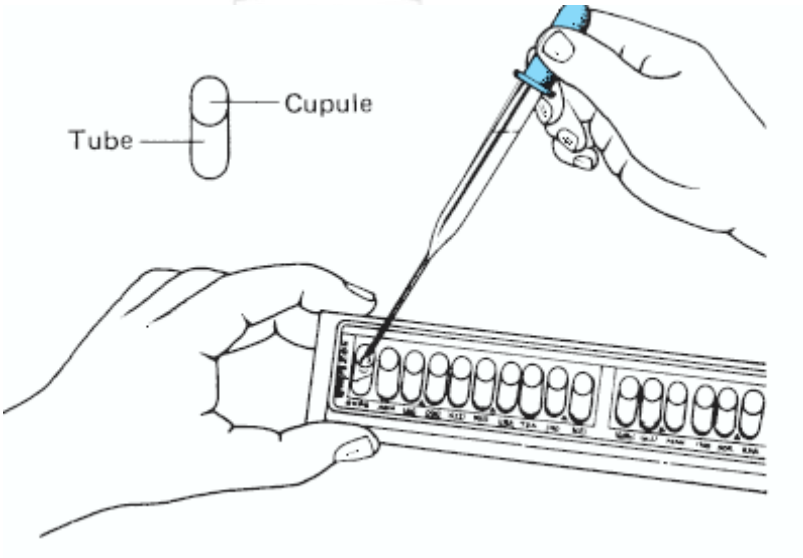
6. ดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมันจะเห็นแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกติดสีม่วงหรือน้ำเงินของ crystal violet ส่วนที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จะติดสีแดงหรือชมพูของ safranin o

การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB/E Kits

<u>วิธีการทดสอบ</u>

1. เตรียมสารละลายของเซลล์แบคทีเรีย TN79, RS5 และ CMU2 โดย เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NA โดยลากเชื้อให้เต็มหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ใช้ swab ที่ปราศจากเชื้อปาดแบคทีเรียมาทำเป็นสารละลายเซลล์ โดยปรับความหนาแน่นเซลล์ให้มีความ ขุ่นเท่ากับ McFarland No.2 ใน API 50 CHB medium

2. หยอดสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่ปรับความขุ่นเรียบร้อยแล้วลงในหลุมของแผ่นทดสอบ โดยในหนึ่งชุดจะมีแผ่นทดสอบอยู่ห้าแผ่น มีหมายเลขกำกับตั้งแต่ 0 – 49 ซึ่งในแต่ละหลุมจะมีคาร์โบไฮเดรตที่ต้องการทดสอบอยู่ โดยหลุมที่มีหมายเลข 0 เป็น control และการถ่ายสารละลายเซล์ต้องไม่ให้เกิดฟองอากาศ ใส่ไปจนถึงขีดที่กำหนด และปิดหลุมด้วย mineral oil ที่ปราศจากเชื้อ ในแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น facultative anaerobe



3. ปิดฝาและบ่มแผ่นทดสอบโดยการทดลองนี้บ่มเชื้อที่ 29 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลลงในแผ่นบันทึกผลตามปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นโดยถ้า API 50 CHB medium เปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลืองให้บันทึกผลเป็นบวก ถ้ายังคงเป็นสีแดงบันทึกผลเป็นลบ หรือถ้าผลไม่ชัดเจนคือเป็นสีส้มแดง ให้บันทึกผลเป็น “V” ในกรณีของหลุมที่ทดสอบ Esculine (หลุมที่ 25) ถ้าอาหารมีสีดำให้บันทึกผลเป็นบวก ทำการบันทึกผล 2 ครั้ง ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

4. อ่านผลการระบุเชื้อโดยเทียบแผ่นบันทึกผลกับ ตารางการจัดจำแนกเชื้อที่แนบมากับชุดทดสอบ

การเตรียม McFarland standard

เตรียมสารละลาย 1% Barium chloride และ สารละลาย 1% Sulfuric acid แยกกัน จากนั้นผสมสารละลายทั้งสองตามตารางดังนี้

No.	0.5	1	2	3	4	5
1% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
1% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5
Approx. cell density (x 10^8/ml)	1.5	3	6	9	12	15
O.D. at 625 nm	0.08 - 0.1	0.16 - 0.2	0.32 - 0.4	0.48 - 0.6	0.64 - 0.8	0.8 - 1.0

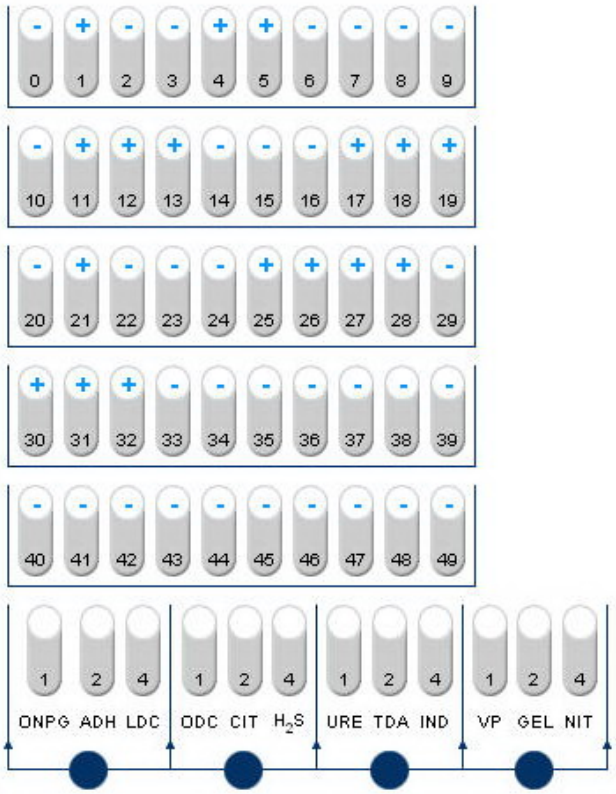
(Baron และ Finegold, 1990)

ผลการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย TN79, RS5 และ CMU2 โดยใช้ API 50 CHB/E Kits

Laboratory of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University - Chiang Mai

apiweb

API 50 CHB V4.0



REFERENCE **DATE**

TN79 7/29/08

COMMENT

VERY GOOD IDENTIFICATION

Strip	API 50 CHB V4.0
Profile	-+--++-----+++---+++-+---+++++-+++----------
Note	

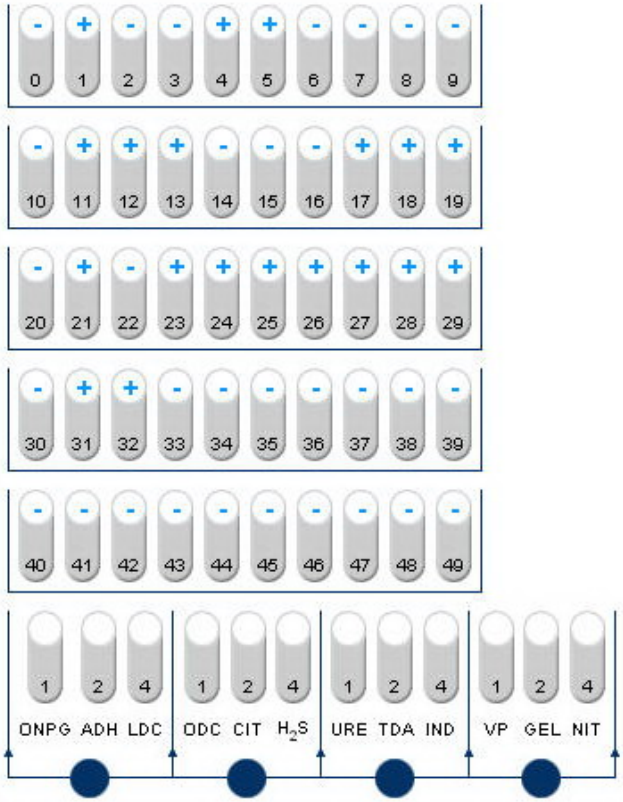
Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Bacillus subtilis/amyloliquefaciens	99.5	0.74	ARB 80%	AMD 78%	GLYG 79%	

Next taxon	% ID	T	Tests against			
Geobacillus thermoglucosidasius	0.3	0.53	INO 4%	MEL 10%		

Laboratory of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University - Chiang Mai

apiweb

API 50 CHB V4.0



REFERENCE **DATE**

RS5 7/29/08

COMMENT

VERY GOOD IDENTIFICATION

Strip	API 50 CHB V4.0
Profile	-+--++-----+++---+++-+-++++++++-++----------
Note	

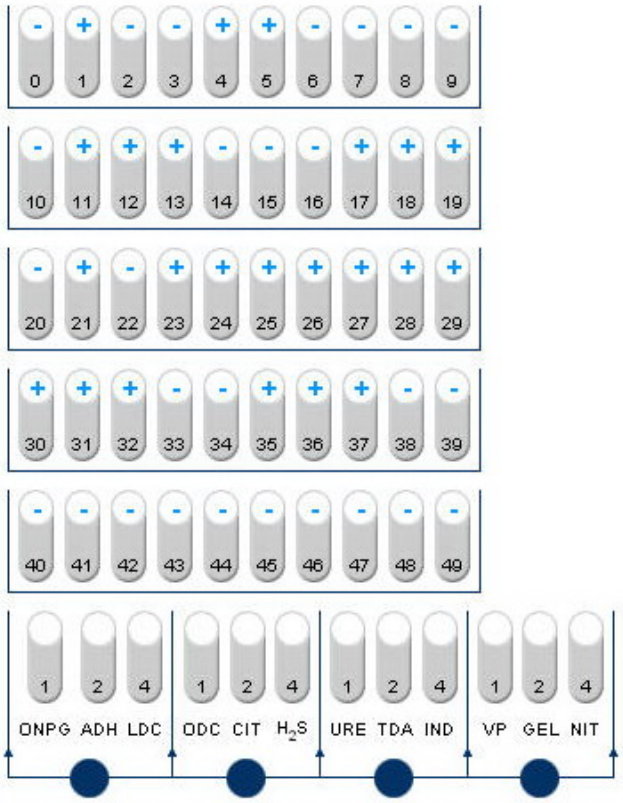
Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Bacillus subtilis/amyloliquefaciens	99.7	0.79	LAC 23%	AMD 78%	GLYG 79%	

Next taxon	% ID	T	Tests against			
Bacillus pumilus	0.1	0.42	INO 11%	SOR 2%	LAC 14%	TAG 90%

Laboratory of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University - Chiang Mai

apiweb

API 50 CHB V4.0



REFERENCE **DATE**

CMU2 7/29/08

COMMENT

VERY GOOD IDENTIFICATION

Strip	API 50 CHB V4.0
Profile	- + - - + + - - - - - + + + + - - - + + + - + - + + + + + + + + + + - - + + + - - - - - - - - - - - -
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Bacillus subtilis/amyloliquefaciens	99.2	0.92	LAC 23%			

Next taxon	% ID	T	Tests against			
Bacillus licheniformis	0.6	0.63	DXYL 87%	GAL 75%	TUR 75%	TAG 91%

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ตามคุณสมบัติทางชีวเคมี (MacFaddin, 2000)

Test	*B. anthracis*[b]	*B. cereus*[c]	*B. circulans*	*B. coagulans*	*B. firmus*[d]	*B. licheniformis*	*B. megaterium*	*B. pumilis*	*B. sphaericus*[d]	*B. stearothermophilus*[e]	*B. subtilis* subsp. *subtilis*
Gram, stain reaction	+	+	V	+	+	+	+	+	V	V	+
Catalase[f]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V
Nitrate reduction	+	+	V+	V	V	+	V	−	−	−	V+
Spores[g]											
Ellipsoidal	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+
Spherical	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
Central	−	+	V	V	V	+	+	+	−	−	+
Terminal or subterminal	+	−	V	V	V	−	−	−	+	+	−
Swelling of sporangia		−	+	V	−	−	−	−	+	+	−
β-hemolysis, 5% SBA	−	V+[h]	−	V	−	+	−	V	−	−	V
Capsule	+/−[i]	−	+	−	−	−	NR	−	NR	NR	−
Motility	−	V+	V+	+	V+	+	+[k]	+	+	+	+
OF glucose	F	F	F/O	F	O	F	O	O	O	F/O	F
Growth											
Anaerobic	G	G	V	G	NG	G	NG	NG	NG	NG	NG
7.5% NaCl	G	G	V	NG	G	G	G	G	V	NG	G
Carbohydrates											
Glucose	A	A	A	A	A	A	A	A	−	A	A
Arabinose	−	−	−	V	V	A	V+	A	−	V	A
Mannitol	−	−	−	V	A	A	V+	A	−	V	A
Xylose	−	−	V	V	V	A	V+	A	−	V	A

Misc. tests												
Gelatin liquefaction, 22°C	+[l]	+	+	−	+	+[l]	+[m]	+	V	+		+[l]
Indole	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−		−
Lecithinase	+[n]	+	−[n]	−	−	−[n]	−[n]	−	−	−		−
Phenylalanine deaminase	−	−	−	−	+	−	V	−	+	−		−
Simmons citrate	V	+	−	−	−	+	+	+	−	−		+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+		+
Urease	−	V	−	−	−	V	V	−	V	V		V
Voges-Proskauer[o]	+	+	−	V	−	+	−	+	−	−		+

V, Variable; V+, variable, usually positive; G, growth; NG, no growth; +w, weekly positive; SBA, sheep blood agar.

Data from references 26, 36, 40.

[a]Generally it is **not** necessary to identify species, except for *B. anthracis*, causative agent of anthrax, and *B. cereus* and *B. licheniformis*, causative agents of food poisoning. A few other species listed here may be implicated in food poisoning and in human infections.

[b]Virulent and avirulent strains.

[c]*B. cereus* and *B. cereus* var. *mycoides*. *B. cereus* is frequently β-lactamase positive (19).

[d]Strict aerobe. *Bacillus* spp. that are strict aerobes **may** appear as nonfermentative Gram-negative bacilli on Kligler's iron agar (KIA) or triple sugar iron agar (TSI).

[e]*B. stearothermophilus* **no growth** at 35°C; growth at 65°C.

[f]Catalase usually positive; exceptions exist but are **not** likely to be seen in clinical specimen isolates.

[g]One endospore per mother cell (sporangium) in the presence of oxygen.

[h]On 5% sheep blood agar (SBA), *B. cereus* positive β-hemolysis; *B. cereus* var. *mycoides* is variable, usually positive.

[i]Virulent *B. anthracis* has a capsule; avirulent *B. anthracis*, no capsule. Capsule is formed under appropriate conditions (with HCO_3 and anaerobic or CO_2). Capsule is visible when stained with a polychrome methylene blue (M'Fadyean) stain.

[j]*B. cereus* is motile; *B. cereus* var. *mycoides* is usually nonmotile; motility depends on growth medium used.

[k]*B. megaterium* requires free aeration for a **slow** positive motility.

[l]Slow.

[m]Rapid.

[n]A weak positive lecithinase reaction, visible only beneath colony when growth is scraped away.

[o]Incubate an additional 24 h at 37°C.

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายทดสอบ และ บัฟเฟอร์

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Agar (Criterion, USA.)

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Sodium chloride	8 กรัม
Agar	15 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นให้เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. Nutrient Broth (Criterion, USA.)

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Sodium chloride	8 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นให้เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. Potato dextrose Agar (Criterion, USA.)

Dextrose	20 กรัม
Potatoes, Infusion form	4 กรัม
Agar	15 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นให้เป็น 5.6 นำไปทำไร้เชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. Starch Broth

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Potato starch	10 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปทำไร้เชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5. MR – VP medium (Merck)

Peptone	7 กรัม
Phosphate buffer	5 กรัม
Dextrose	5 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 6.9 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปทำไร้เชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

6. Simmon citrate agar (Scharlau)

Monoammonium phosphate	1 กรัม
Dipotassium phosphate	1 กรัม
Magnesium sulfate	0.2 กรัม
Sodium citrate	2 กรัม
Sodium chloride	8 กรัม
Bromthymol blue	0.08 กรัม
Agar	15 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง ให้เป็น 6.7 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปทำไร้เชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที นำออกมาเอียงให้มีลักษณะเป็นอาหารวุ้นเอียง

7. MIL medium (Himedia)

Peptic digest of animal tissue	10 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
L-Lysine hydrochloride	10 กรัม
Dextrose	1 กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5 กรัม
Bromocresol purple	0.02 กรัม
Bacto agar	2 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 6.6 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปทำไร้เชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

8. Nutrient Agar with 7.5% NaCl

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Sodium chloride	75 กรัม
Agar	15.0 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นให้เป็น 7.0 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปทำไร้เชื้อที่ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที นำออกมาเอียงให้มีลักษณะเป็นอาหารวุ้นเอียง

9. Carbohydrate fermentation medium

Peptone	5 กรัม
Beef extract	3 กรัม
Sugar	10 กรัม
Bromthymol blue 1.6%	4 มิลลิลิตร
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

ในการทดลองนี้ใช้น้ำตาล 4 ชนิดมาทดสอบคือ กลูโคส, แมนนิทอล, ไซโลส และ อาราบิโนส การเตรียมน้ำตาลแต่ละชนิด ควรเตรียมหลอดทดลองที่ใส่หลอดดักก๊าซไว้แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงเตรียมน้ำตาลใส่หลอดประมาณ 6 มิลลิลิตร แล้ว

น้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ

1. Kovac's solution

Para-dimethyl- aminobenzaldehyde	5 กรัม
Butyl alcohol	75 มิลลิลิตร
HCL concentrate	25 มิลลิลิตร

ผสม Para-dimethyl- aminobenzaldehyde กับ Butyl alcohol ในวอเตอร์บาท อุณหภูมิ 30 - 60 องศาเซลเซียส 5 นาที ขณะปล่อยให้เย็นริน HCL ลงไปให้เข้ากันเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Lugol's iodine

Iodine	5 กรัม
Potassium iodine	10 กรัม
Distilled water	100 มิลลิลิตร

ละลาย Potassium iodine ในน้ำกลั่นก่อน แล้วจึงค่อย ๆ เติมผลึกของ Iodine ลงไปละลายทีละน้อย จนละลายหมด เติมน้ำให้ละลายเจือจาง 5 เท่า

3. Methyl red solution

Methyl red	0.8 กรัม
Ethanol 95%	300 มิลลิลิตร
Distilled water	200 มิลลิลิตร

ละลายสี methyl red ใน 95% ethanol แล้วจึงเติมน้ำกลั่น

4. Voges - Proskauer test solution

Solution A:

Alpha napthol	10 กรัม
Ethanol 95%	100 มิลลิลิตร

ละลาย Alpha napthol ใน 95% ethanol เก็บในขวดสีชา

Solution B:

KOH	10 กรัม
Distilled water	100 มิลลิลิตร

ละลาย KOH ในน้ำกลั่นเก็บในขวดสีชา

การเตรียม phosphate buffer

Phosphate Buffer pH 7.0 ใช้สกัด 0.144 % Na_2HPO_4 : 0.024 % KH_2PO_4

Na_2HPO_4	0.72 กรัม
KH_2PO_4	0.12 กรัม
Distilled water	500 มิลลิลิตร

ปรับค่า pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีค่าอยู่ในช่วง 5 - 9 โดย 1M Na_2HPO_4 และ 1M K_2HPO_4

ภาคผนวก ค

องค์ประกอบของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียสายพันธุ์ TN79, RS5 และ CMU2

ตารางที่ ค.1 สารประกอบที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 ด้วยเครื่องมือ GC-MS

Retention time	area	Compounds	QUAL
5.259	0.27	(Z)-Methyl-5-[(E)-3-(1-ethoxyethoxy)oct-1-en-1-y1]tetrahydrofuran-2-ylideneacetate	14
5.259	0.66	Methyl pentachlorosterate	38
5.322	1.33	DL-Serine, methyl ester, hydrochloride	9
5.533	6.62	Isobutyric acid	59
5.591	0.73	Hexanamide	33
5.831	4.70	2-Methylbutanoic acid	83
6.396	0.10	2-Ethylbutyl acrylate	38
7.014	0.16	Phenyl N-methylcarbamate	46
7.385	1.06	Benzeneacetaldehyde	64
7.671	3.55	Benzeneacetaldehyde	87
7.940	2.10	Benzeneacetaldehyde	60
8.848	0.67	Methyl 3-furoate	64
10.077	0.25	4(1H)-Pyridinone, 2, 3-dihydro-1-methyl-	43
10.380	0.19	2-Acetylthaizole	46
14.146	0.49	3,6-ANHYDRO-D-GLUCOSITOL	30
14.581	1.18	1,4-Pentanediamine, N1,N1-diethyl-	43
17.598	0.19	cis-1,4-Diacetoxycyclohexane	50
		trans-1,4-Diacetoxycyclohexane	50
18.084	0.43	3-Phenylpyridine	81
18.553	0.30	1-Dodecanol	45
19.427	0.21	Dibutylphenol	60
		Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	60
21.073	0.59	2-Ethyl-quinoline	62
21.982	0.26	TRANS-1,10-DIMETHYL-TRANS-9-DECALO	51
22.485	1.14	1H-Azepine-1-butanamide, hexahydro-.alpha.,.alpha.-diphenyl-	38
22.742	0.20	Trans-1,10-Dimethyl-trans-9-decalo	52

Retention time	area	Compounds	QUAL
22.954	0.40	L-MENTHAL ONE (name?)	38
		2,8-Diazaspiro(4,4)nonane-3,9-dion	38
23.331	0.57	Methyl 4,6-decadinyl ether	70
23.960	0.47	4-Methyl-cyclohex-2-en-1-ol	30
24.583	0.51	3,4-Dihydroxy-5-metoxybenzaldehyde	38
25.034	1.94	1,4-diaza-2, 5-dioxobicyclo[4.3.0]nonane	89
		Pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione,hexahydro	89
26.114	0.45	2-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-cylohex-2-enone	38
		10,10-Dicyano-9-ethenyl-8-azatricyclo[5.3.0.0(3,6)]deca-1,4,8-triene	38
26.720	0.73	4-Methyl-2,7-dioxa-tricyclo[4.4.0.0(3,8)]decane	42
28.069	0.37	4-(2,2-Difluoroethenyl) toluene	59
28.480	0.85	1,4-diaza-2, 5-dioxo-3-isobutyl bicyclo [4.3.0]nonane	59
28.709	0.90	Alanine, 2-methyl-N-(trifluoroacetyl)-, butyl ester	43
29.572	0.28	2,3 - Dihydro-1H-cyclopenta[c]quinoline N-Oxide	25
		1,2,3,4-Tetrahydro-9-methyl-1-trifluoroacetylcarbozole	25
30.362	0.32	1-CHL0ROMETHYLENE-DECAHYDRO-NAPTHALENE	55
30.458	0.18	3-(Diphenylmethylene)bicyclo [3.2.0] hept-6-en-2,4-diol	35
		3-Chloro-1,4-dimethyl-2-quinolone	35
31.127	0.30	1, 2-Epoxy-1-vinylcyclododecene	59
33.018	43.86	Octadec-9-enoic acid	99
34.087	5.94	trans-Oleic acid	99
34.533	8.96	Octadec-9-enoic acid	93
36.047	2.36	2-(1'-METHYLINDOL-3'-YL) ETHENE-1,1-DECORBONITRILE	55
36.545	0.53	2, 3, 4-Trimethoxyphenylacetronitrile	35
		2, 3-DIHYDRO-2-(2-HYDROXYPHENYL)-4-PHENYL-1, 5-BENZOTHIAZAPINE	35
		2-(Acetoxymethyl)-3-(methoxycarbonyl) biphenylene	35
39.334	0.93	Iron, tetracarbonyl-[(chloro) (chloromethyl)	44

Retention time	area	Compounds	QUAL
		(diethylamino)phosphine]	
39.642	1.75	Indole-2-one, 2, 3-dihydro-N-hydroxy-4-methoxy-3, 3-dimethyl-	15
		1H-Indole, 1-methyl-2-phenyl-	15
		Cyclobarbital	15

ตารางที่ ค.2 สารประกอบที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 ด้วยเครื่องมือ GC-MS

Retention time	area	Compounds	QUAL
5.253	0.23	Trimethylaminoacetic acid	64
5.979	0.23	3, 3-Dimethylpyrrolidine-2, 5-dione	40
6.391	5.15	Butanoic acid	9
6.556	5.48	Isobutyric acid	42
6.665	9.37	Isobutyric acid	42
6.728	1.96	Propane, 1-ethoxy-2-methyl-	33
6.951	3.23	2-Methylbutanoic acid	59
6.991	1.24	2-Methylbutanoic acid	72
7.174	4.00	Benzeneacetaldehyde	83
		Styrene oxide	83
7.248	4.46	Benzeneacetaldehyde	70
7.505	1.24	Benzeneacetaldehyde	35
7.642	0.80	Oxime-, methoxy-phenyl-	50
8.763	0.67	Pantolactone	68
		2,4-DIHYDROXY-3, 3-DIMETHYLBUTANOIC ACID . GAMMA. -LACTONE	68
8.825	0.65	4' METHYL-2 PHENYLINDOLE	18
9.163	0.54	2-Pyrrolidinone	52
9.740	0.49	Oxime-, methoxy-phenyl-	46

Retention time	area	Compounds	QUAL
9.929	0.30	[1, 2, 4]-Triazol [1,5-a]pyridine, 2-methyl-	30
		Oxime-, methoxy-phenyl-	30
10.403	0.94	4(1H)-Pyridinone, 2, 3-dihydro-1-methyl-	50
10.660	0.55	N-Acetylpyrrolidone	70
11.677	0.38	1-Aminoadamantane	46
		5-Vinyl-pyrazole	46
12.981	0.37	3, 3-Diisopropoxy-1, 1, 1, 5, 5, 5-hexamethyltrisiloxane	47
		Cyclotrisilxane, hexamethyl	47
13.815	0.74	Cyclotrisilxane, hexamethyl	38
14.289	0.86	1-Methyl-2-cyanobenzene	38
14.598	3.18	1,4-Pentanediamine, N1,N1-diethyl-	47
15.209	0.28	4-Methylquinazoline	92
16.261	0.23	3, 3-Diisopropoxy-1, 1, 1, 5, 5, 5-hexamethyltrisiloxane	43
17.341	0.48	4-Bromo-2-chloroanline	30
17.616	1.17	Bicyclo[2, 2, 2]oct-5-en-2-ol	52
		3-Cyclohexene-1-acetaldehyde	52
18.113	1.44	3-Phenylpyridine	93
18.404	0.77	Cyclododecane	94
19.473	0.72	Phenol, 2, 5-bis(1, 1-dimethylethyl)	70
20.416	1.24	3-Methylisoquinolone	90
21.136	2.10	1-Aminomethylnapthalene	64
21.845	0.21	2-Fluoro-4-phenylpyrimidine	46
22.754	5.14	1-Methyl-2-ethyl-5-undecylpyrrolidine	80
22.817	1.06	1-Methyl-2-ethyl-5-undecylpyrrolidine	74
22.971	2.74	2, 4(1H, 3H) - Pyrimidinedione	52
23.354	4.47	cis-1,2,6-Trimethylpiperidine	64
24.062	1.76	1, 2, 4-Cyclopentanetrione	38
24.365	0.74	. Alpha .-(15N-Cyano)-2-cyanoyoluene	70
24.674	1.49	Thioxolone	27
25.143	6.74	1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nonane	91

Retention time	area	Compounds	QUAL
		Pyrrolo[1,2-a]piperazine-3,6-dione	91
26.200	1.42	p-(Methylthio) benzyl alcohol	43
26.806	1.90	3, 5-Dimethoxyphenol acetate	53
28.183	0.88	1, 3-Cyclohexanedione, 2, 5, 5-trimethyl-	59
28.556	2.56	1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]nonane	43
28.806	4.07	Phenol, 3,5-dimethoxy-	47
29.641	0.90	3-Hydroxydiphenylamine	89
30.299	0.50	Benzene, 1-methoxy-3-(methylthio)-	55
31.149	0.28	trans-Oleic acid	83
32.750	0.87	Octadec-9-enoic acid	99
33.127	0.45	HEPTADECENE-(8)-CARBONIC ACD-(1)	99
33.516	1.89	Octadec-9-enoic acid	98
34.167	1.12	Octadec-9-enoic acid	99
		HEPTADECENE-(8)-CARBONIC ACD-(1)	99
		trans-Oleic acid	99
36.665	0.52	HEPTADECENE-(8)-CARBONIC ACD-(1)	99
		trans-Oleic acid	99
39.397	0.32	2-(Acetoxymethyl)-3-(methoxycarbonyl)biphenylene	46
40.597	1.52	9-Octadecanoic acid, (Z)-, 2, 3-dihydroxypropyl ester	90
40.728	0.50	Cyclopropaneoctanal, 2-octyl-	78
43.803	0.45	DI-(9-OCTADECENOYL)-GLYCEROL	35

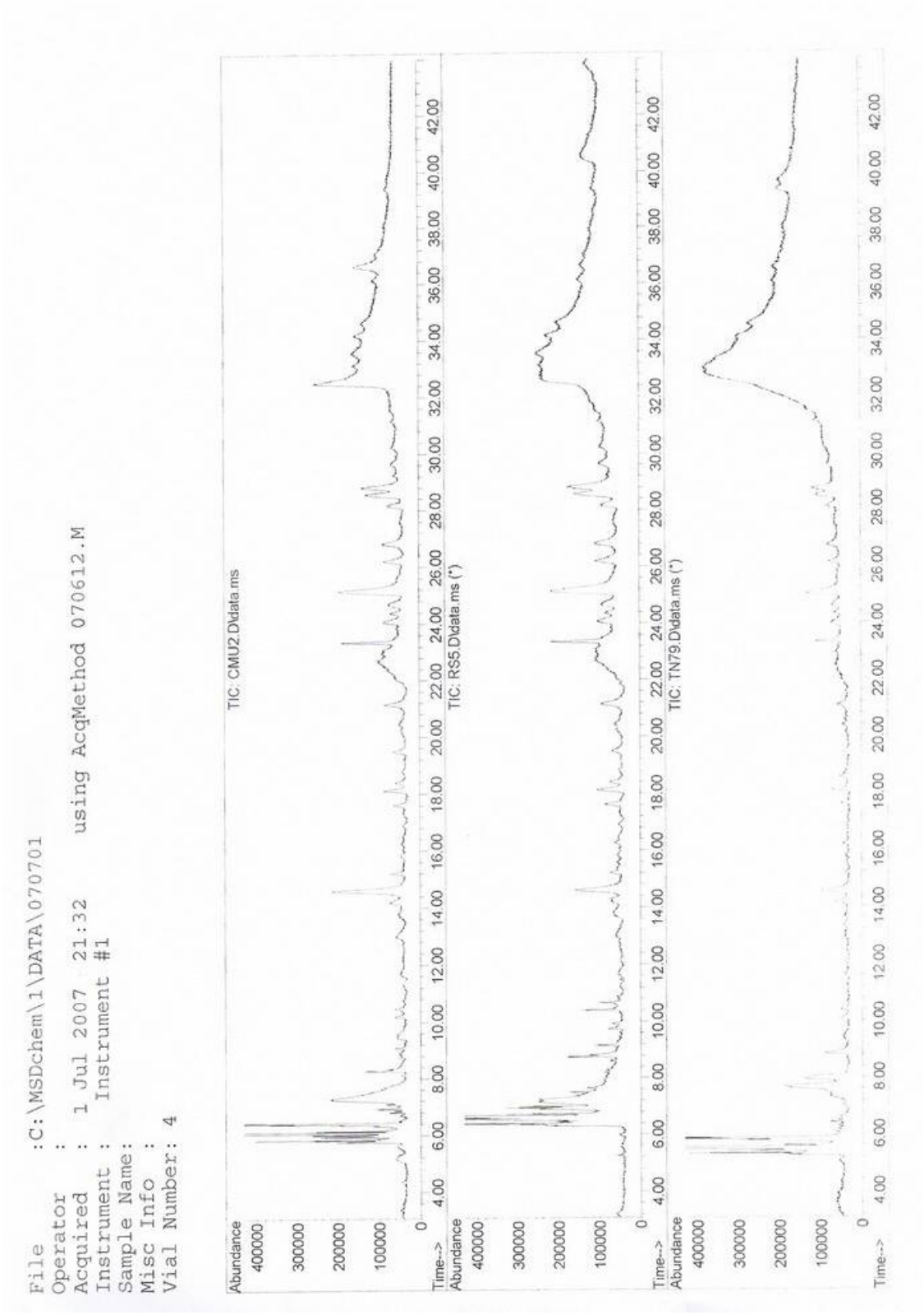
ตารางที่ ค.3 สารประกอบที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 ด้วยเครื่องมือ GC-MS

Retention time	area	Compounds	QUAL
5.179	0.95	1, 6-Dideoxy-monoethlene-d-altrio	33
5.613	0.66	Ethane, 1, 2-dichloro-	35
		2, 2-bis(trideuteriomethyl)-1, 3-oxathaiolane	35
5.773	1.30	6-Methylbicyclo[4.4.0]decane-2,9-diol isomer	35
5.836	1.83	Butanoic acid	9
5.951	1.03	Propanoic acid	46
6.008	1.24	Isobutyric acid	64
6.105	7.77	Isobutyric acid	59
6.431	5.15	2-Methylbutanoic acid	83
6.694	0.16	Oxime-, methoxy-phenyl-	52
6.814	0.19	Propanamide, 2-methyl-	50
6.865	0.16	2-Butenoic acid, 2-methyl-	41
6.934	0.41	3, 4-Dihydropyran	43
7.014	0.21	(4R, 5R)-2-Mesityl-1, 3-dioxolane-4, 5-dicarbonsaure-dimethylester	22
7.094	0.37	1, 3, 4-Thiadiazole-2(3H)-thione	38
7.288	8.93	Benzeneacetaldehyde	87
		Oxirane, phenyl-	87
7.699	1.20	Benzeneacetaldehyde	42
8.288	1.33	Pantolactone	74
		2,4-DIHYDROXY-3, 3-DIMETHYLBUTANOIC ACID . GAMMA. -LACTONE	74
8.768	0.18	Heptane, 4, 4-dimethyl-	47
		Octane	47
9.094	0.34	2-ETHYL-5-METHYLTHIOPHENE	27
9.534	0.48	Benzeneethanamine	50
9.608	0.36	Oxime-, methoxy-phenyl-	25

Retention time	area	Compounds	QUAL
10.191	0.27	Oxazole, trimethyl-	49
10.471	0.43	N-Acetylpyrrolidone	70
11.723	0.48	1-(1H-pyrrol-3-yl)-2, 2-dimethyl-1-propanone	27
		2-(1'-13C-(-BUTYL)PYRIDINE	27
		2-(3', 3'-DIDEUTEROBUTYL)PYRIDINE	27
12.975	0.74	Carprolactam	41
13.849	0.37	1, 1, 1, 3, 5, 5, 5-Heptamethyltrisiloxane	47
14.192	0.78	Benzyl nitrile	46
		(E)-1-Azido-2-phenylethene	46
		Benzeneacetronitrile	46
14.609	4.60	1-Propanol, 3-(diethylamino)-	43
		1,4-Pentanediamine, N1,N1-diethyl-	43
15.221	0.46	Quinozoline, 2-methyl-	60
17.615	1.11	1-Penten-3-yne, 2-methyl-	52
		Bicyclo[2.2.2]oct-5-ene-2-carbonitrile	52
18.124	1.10	3-Phenylpyridine	93
18.398	0.56	Cyclododecane	95
19.496	0.70	Phenol, 2, 4-bis(1, 1-dimethylethyl)	81
20.473	0.43	Quinoline, 4-methyl-	92
21.148	1.44	1-Aminomethylnapthalene	64
		1-Methyl-1, 4-dihydro-1, 4-iminonapthalene	64
22.388	2.34	Clomethiazole	53
22.742	3.98	1-Methyl-2-ethyl-5-undecylpyrrolidine	64
22.982	1.13	Uracil	49
23.068	1.50	Phenol, 4-fluoro-	46
23.359	2.75	Dodecyl acrylate	64
24.068	1.41	1R, 2C, 4T, 5T-1, 2, 4, 5-TETRAMETHYLCYCLOHEXANE	25
24.377	0.63	1-N-BUTYLQUINOLINE	70
24.697	1.11	9-Methyl-6-oxaspiro[4.5]decan-7-one	43
25.154	5.36	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-	91

Retention time	area	Compounds	QUAL
		1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nonane	91
26.211	1.12	Imidazole, 4-fluoro-2-trifluoromethyl-	38
26.811	1.79	Phenol, 3,5-dimethoxy-	50
28.177	0.83	Phenol, 3,5-dimethoxy-	46
28.572	2.26	1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]nonane	50
28.823	2.87	Phenol, 3,5-dimethoxy-	47
		2(3H)-Furanone,3-(dihydro-2-(3H)-furanylidene)dihydro-	47
29.258	0.36	2H-Azepin-2-one, 1-[3-[(3-amiopropyl)aminopropylhexadro-	40
29.646	0.76	3-Hydroxydiphenylamine	53
30.235	0.46	8-Phenylisoquinoline	62
31.567	0.18	Undecanoic acid, 11-bromo-, undecyl ester	15
32.512	10.60	trans-Oleic acid	99
33.138	2.82	Oleic acid	99
33.584	4.07	Octadec-9-enoic acid	96
		Cyclopropaneoctanal, 2-octyl	96
34.207	2.09	Octadec-9-enoic acid	95
		trans-Oleic acid	95
34.630	0.39	trans-Oleic acid	97
		HEPTADECENE-(8)-CARBONIC ACD-(1)	97
36.942	2.00	9-Octadecanamide, (Z)-	95

ภาพที่ ค.1 เปรียบเทียบผลการแยกสารประกอบของแบคทีเรีย TN79, RS5 และ CMU2 โดย GC - MS



ภาคผนวก ง

ข้อมูลเชิงตัวเลขแสดงค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ที่สภาวะทดสอบต่างๆ

ตารางที่ ง.1 ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ (% เฉลี่ย ± SD)

แบคทีเรีย	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
TN79	00.00 ± 2.08	51.47 ± 0.00	52.94 ± 0.58	53.73 ± 0.58	53.73 ± 0.58	50.75 ± 0.00
RS5	44.29 ± 0.00	55.71 ± 0.58	55.70 ± 0.58	55.71 ± 0.58	53.73 ± 0.00	52.86 ± 0.00
CMU2	00.00 ± 1.53	52.24 ± 0.58	52.24 ± 0.58	53.73 ± 0.58	53.73 ± 0.00	50.75 ± 0.00

ตารางที่ ง.2 ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิต่างๆ (% เฉลี่ย ± SD)

แบคทีเรีย	30	37	45	55	70	80
TN79	55.07 ± 0.58	56.06 ± 0.58	50.72 ± 0.58	49.28 ± 1.15	48.33 ± 0.58	45.00 ± 0.00
RS5	50.72 ± 0.58	56.52 ± 0.00	47.83 ± 0.00	46.38± 0.58	55.07 ± 0.58	46.67 ± 0.58
CMU2	47.83 ± 0.00	53.62 ± 0.58	46.38 ± 0.58	46.38± 0.58	48.33 ± 0.58	46.67 ± 0.58

ตารางที่ ง.3 ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยสารสกัดจากแบคทีเรียหลังจากการนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ ต่างๆเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง (% เฉลี่ย ± SD)

อุณหภูมิ (°C)	TN79[a]	RS5[a]	CMU2[a]
Control[b]	34.78 ± 1.00	31.82 ± 1.00	37.68 ± 0.58
37	16.67 ± 0.58	15.94 ± 1.15	16.67 ± 0.58
50	15.94 ± 2.31	14.49 ± 0.58	15.94 ± 1.15
60	15.94 ± 1.53	15.94 ± 1.15	15.94 ± 0.58
70	16.67 ± 0.58	15.94 ± 1.15	15.94 ± 0.58
80	16.67 ± 0.58	13.04 ± 0.00	14.49 ± 0.58
Autoclaved[c]	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00

หมายเหตุ: [a] สายพันธุ์แบคทีเรีย, [b] กลุ่มควบคุมไม่ผ่านความร้อน, [c] เป็นเวลา15 นาที

ตารางที่ ง.4 แสดงค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL เมื่อใช้สารสกัดที่ผ่านการเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง (% เฉลี่ย ± SD)

แบคทีเรีย	สารสกัดที่ไม่เติมเอนไซม์	สารสกัดที่เติมเอนไซม์
TN79	34.78 ± 1.00	33.33 ± 0.58
RS5	31.82 ± 1.00	31.88 ± 1.15
CMU2	37.68 ± 0.58	36.23 ± 0.58

ตารางที่ ง.5 แสดงค่าการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยสารสกัดจากแบคทีเรียที่นำไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 30 นาที และ 1 ชั่วโมง (% เฉลี่ย ± SD)

แบคทีเรีย	0 [a]	30[a]	60 [a]
TN79	34.78 ± 1.00	34.72 ± 0.58	34.72 ± 0.58
RS5	31.82 ± 1.00	30.43 ± 1.00	31.88 ± 0.58
CMU2	37.68 ± 0.58	37.18 ± 0.58	29.17 ± 1.00

หมายเหตุ: [a] หมายถึงระยะเวลาที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลตเป็นนาที

ภาคผนวก จ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s r RNA gene ของแบคทีเรียสายพันธุ์ TN79, RS5 และ CMU2

TN79 (EU590118)

TCGACTGGCGGCGTGCCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCT
TGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC
CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTG
TCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACA
GATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGAT
CGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGC
ACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
GGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCG
GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA
ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG
CTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG
CACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGT
CCCCTTCG

RS5 (EU590117)

GGGATTTGTGGGCTTGCTTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGC
TTGCTCCCTGATGTTAGCGGTGGAAGGAGGAGTAACACGTGGGTAACCTG
CCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTT
GTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTAC
AGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGA
TCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTGTTCAAATAGGGCGG
CACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACC
GGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG
AATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG
GCTAAAGCGACTCTCTGGTCTGTCACTGACGCTGAGGAGCGAACGCGTGG

TGAGCGAACAGGATTAGATATCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
GCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCCGCCCCTTAGTGCTGCATCTAACGCATTA
AGTACTTCTCCTGGGGGAGTACGGTCGCAGACTGCAACTTCAAGGATTTG
ACGGGGGCTCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGGTTTATTCGAAGCACCCAA
GAATCCTTACCAGGTCTTGACTTCCTTTGACATCCTTGAGATAGGAGTTC
CCTTTC

CMU2 (EU590116)

TCGGAATTGCCGGCGTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCT
TGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC
CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTG
TTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACA
GATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGAT
CGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGC
ACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
GGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCG
GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA
ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG
CTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG
CACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCACGCGAA
GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACATCCTAGAGATAGGACGTCC
CCTTCGGGGGCAG

ภาคผนวก ฉ

ผลงานตีพิมพ์ / การนำเสนอผลงาน

การควบคุมเชื้อ ***Lasiodiplodia* spp.** โดยชีววิธีของแบคทีเรีย ***Bacillus*** ที่แยกจากถั่วเน่า

Biocontrol of *Lasiodiplodia* spp. by *Bacillus* Species Isolated from *Thua Nao*

กาญจนา นิรภัย[1] อุราภรณ์ สอาดสุด[2] และ เอกชัย ชูเกียรติโรจน์[1]

Kanjana Niraphai[1], Uraporn Sardsud[2] and Ekachai Chukeatirote[1]

[1]School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100, Thailand
[2]Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

บทคัดย่อ: ในงานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่าที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* จากจำนวนเชื้อทั้งหมด 170 ไอโซเลท พบว่า มี 39 สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ผลของการยับยั้งมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 25 – 67.5 จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง และสามารถสร้างสปอร์ได้ การใช้แบคทีเรียเหล่านี้อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยว

Abstract: One hundred and seventy bacterial strains previously isolated from *thua nao* were screened for their antagonistic ability against *Lasiodiplodia* species. Of these, 39 strains were able to inhibit the fungal growth in dual culture as observed by the inhibitory zones. Radial growth reduction calculated in relation to the control growth was between 25 and 67.5%. Based on cell morphology, most bacterial isolates were Gram-positive, endospore-forming bacilli. These bacterial species offer a potential use as a biocontrol agent(s) of the postharvest pathogen *Lasiodiplodia*.

Introduction: *Lasiodiplodia theobromae* is one of the most important fungal postharvest pathogens that cause a serious concern in various kinds of fruits such as longan, banana, and rambutan. To control these postharvest diseases, fungicides have traditionally been used. However, with the problems of resistant fungal emergence as well as chemical contamination, the use of fungicides becomes ineffective and unpopular. In the past decade, many attempts have been made to screen natural substances derived from plants and microbes that can be used as an alternative in controlling the postharvest diseases. The present study describes the potential use of some *Bacillus* species isolated from *thua nao* in controlling the growth of *Lasiodiplodia*, the fungal causative agent of postharvest diseases.

Methodology: The fruit-rot pathogen, *Lasiodiplodia* spp., was isolated from infected longan fruits in Chiang Mai. The bacterial isolates used to test antagonistic effect were previously isolated from *thua nao*, a traditionally fermented soybean in Chiang Rai. To study the inhibitory activity, the dual culture tests were performed by placing the fungal mycelia and bacterial colony on the centre of the PDA plates. Antifungal activity was noted by observing the inhibition of the mycelial growth. Radial growth reduction was calculated as follows: (a – b) / a (where a = radial growth measurement of the pathogen in control and b is that of the pathogen in the presence of bacteria tested); these values were then expressed as percentage inhibition of radial mycelial growth. The bacteria exhibited antagonistic activity were subject to further cell morphological characterisation.

Results, Discussion and Conclusion: Postharvest diseases in fruits and vegetables are serious concerns and cause a great loss worldwide especially in the tropics. *Lasiodiplodia* spp. are well known as a causative pathogen of fruit rots under inappropriate storage. Thaiabendazole and benomyl are commonly used fungicides in combating these postharvest diseases. Recently, biocontrol is expected to be a promising strategy for controlling postharvest fruit diseases due to several benefits (i.e., safety concern). However, there is limited work regarding the use of biocontrol for *Lasiodiplodia*. In this study, 170 bacterial strains isolated from *thua nao* were tested against the fungal pathogen *Lasiodiplodia*. Most *thua nao* bacteria are classified into the Genus *Bacillus*[1] in which its antagonistic activity has been reported.[2] The bioassay was initially evaluated by the degree of growth inhibition using dual culture technique. Of these bacteria tested, 39 isolates (~23%) exhibited antifungal activity. All isolates were Gram-positive, endospore-forming bacilli based on cell morphology. Further study is now being undertaken to determine the identity of the active compound(s) and the microbial source. These preliminary results prove to be the most promising step before the field trial.

References:

(1) Chukeatirote E *et al*. (2006) *Research Journal of Microbiology* **1**, 38-44.
(2) Sonenshein AL *et al*. (1993) *Bacillus subtilis and other gram positive bacteria*. ASM Press.

Keywords: *Lasiodiplodia*, postharvest diseases, *Bacillus*, *thua nao*, antagonistic activity

POTENTIAL BIOCONTROL AGENTS OF *Lasiodiplodia theobromae* FROM *Bacillus* SPECIES ISOLATED FROM *THUA NAO*

Kanjana Niraphai[1], Phichaya Thirach[1], Uraporn Sardsud[2] and Ekachai Chukeatirote[1,*]

[1]School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100 Thailand.
[2]Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University 50200 Thailand

Abstract

A total of 170 bacteria were screened from *thua nao* to test for their inhibitory ability against the pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. Thirty-nine strains (23%) belonging to the Genus *Bacillus*, inhibited *L. theobromae* hyphal growth from 25 to 67.5% using a dual culture test on potato dextrose agar medium. Due to its highest inhibitory activity, Bacillus strain TN79 was selected for further study including species identification based on API50 CH kit and 16S rRNA sequencing, Interestingly, antifungal substances were produced only when *Bacillus* strain was cultured on nutrient agar plate. The antifungal compounds purified from the 2-week nutrient agar culture using phosphate buffer (pH 7.0) remained active when exposed to UV light up to 1 hour and to proteinase K (1mg/ml). The antifungal agents were active over a wide range of pH (6 – 9) and temperature (37 – 80°C). However, autoclaving for 15min at 121°C completely destroyed the antifungal activity.

Keywords: *Lasiodiplodia theobromae*; *Bacillus*; antifungal activity
* Corresponding author. Fax: +66 53 916776.
E-mail address: ekachai@mfu.ac.th (Ekachai Chukeatirote).

Introduction

L. theobromae is one of the most important fungal postharvest pathogens of many tropical fruits such as longan, banana, and rambutan. At present, the disease can be controlled by the use of fungicide. However, this is shown to produce resistant fungi; besides, the remained chemical residues can be harmful to human beings. To prevent such problems, the biological control using antagonistic bacteria may be an appropriate alternative. This present study describes the potential use of *Bacillus* strains isolated from *thua nao* in controlling the growth of *L. theobromae*.

Methodology

To perform *in vitro* antagonistic test, the fungi were initially transferred to the center of PDA plate. The bacterial isolates were then inoculated near the fungal colony (~3cm away from the fungal colony). The plates were incubated at 37°C for 24h. Antifungal activity was then noted by observing the inhibition of mycelial growth. Inhibitory activity was calculated as follows: (a - b) / a x 100 (where a = radial growth measurement of the pathogen in the direction that has no bacterial strain and b is that of the pathogen in the presence of bacteria test) (see Figure 2). The bacteria strain TN79 exhibiting highest antagonistic activity was then identified based on morphological and biochemical characteristics.

The bacteria strain TN79 was subsequently cultured on NA at 37°C for two weeks. The bacterial agar culture was cut into small pieces and then soaked with phosphate buffer to extract antifungal compounds. The supernatant was filtrated and further tested for antifungal activity as previously described.

Stability Test

- Heat: To determine the thermal stability, the antifungal compounds were incubated at 37, 50, 60, 70 and 80°C for 1h; autoclaving at 121°C for 15min was also used.
- Enzyme: The sensitivity to enzyme was tested by using antifungal compounds mixed with proteinase K for 1h.
- UV radiation: The antifungal compounds were exposed directly to UV light (254nm) for 1h at a distance of 20cm.
- pH: The antifungal compounds were tested for their sensitivity to a wide range of pH by adjusted pH of the phosphate buffer to 5, 6, 7, 8 and 9 before mixing with pieces of 2-week NA culture.
- After treated with heat, enzyme, pH, and UV, the supernatants were retreived and tested for inhibitory activity on *L. theobroma*. All experiments were performed with 3 replicates.

Results and Discussion

Table 1 Distribution and proportion of bacterial antagonists isolated from different sources

Sources	Total number of screening microbes	Total number of antagonists*	Inhibitory activity** (%)
thua nao	170	39 (23.00)	25.0 - 67.5
Rhizosphere soil	111	2 (0.02)	45.0 - 50.0
Surface of Longan fruit	3	2 (67.00)	45.9 - 50.0

Notes: *The numbers in parentheses are indicated proportion of antagonists in percentage.
**Inhibitory activity is calculated based on the difference of fungal mycelial growth as indicated in Fig. 2.

Figure 1 Pathogenicity of *L. theobromae* on longan and banana fruits

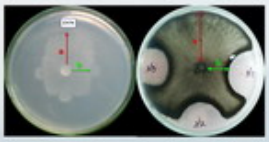
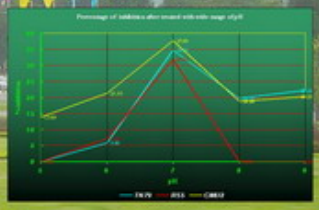
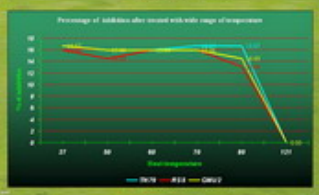


Figure 2 Antifungal activity of *Bacillus* spp. using dual culture method

Figure 3 Cell morphology of bacterial antagonists





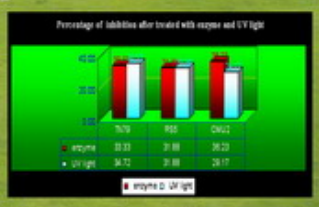


Figure 4 Effects of heat, UV, pH and proteinase K on antifungal property of *Bacillus* crude extracts

References

1. Yu GY *et al.* (2002) Soil Biology & Biochemistry 34: 955-963.
2. Mortuza MG and Ilag LL (1999) Biological Control 15: 235-240.
3. Sivakumar D *et al.* (2000) Phytoparasitica 28, 1-6.

Agricultural Sci. J. 37 (6) (Suppl): 1075-1078 (2006) ว. วิทย์.กษ.37(6) (พิเศษ) : 1075-1078 (2549)

การควบคุมเชื้อราก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยว *Lasiodiplodia* spp. โดยชีววิธี

Biocontrol of *Lasiodiplodia* spp., the fungal causative agent of postharvest diseases

เอกชัย ชูเกียรติโรจน์[1] กาญจนา นิรภัย[1] และ อุราภรณ์ สอาดสุด[2]

Ekachai Chukeatirote[1], Kanjana Niraphai[1] and Uraporn Sardsud[2]

Abstract

In this study, a total of 281 bacteria screened from *thua nao* and rhizosphere soils of five medicinal plants were tested for antagonistic ability against the fungal pathogen *Lasiodiplodia* species. Based on dual culture test, only 41 strains were able to inhibit the mycelia growth of which most strains (39 strains) were from *thua nao* origin. The antagonistic activities were between 25 – 67.5%. In addition, the antagonistic test was also confirmed using their bacterial culture supernatant. Seven best bacterial isolates exhibiting high inhibitory activity were selected for further study including their taxonomic identity and their active metabolites. In a long run, this work is expected to develop as a novel strategy for controlling *Lasiodiplodia* species in the field trial.

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาถึงแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อราก่อโรค *Lasiodiplodia* species ซึ่งทำให้เกิดโรคผลเน่า จากจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 281 สายพันธุ์ที่แยกได้จากถั่วเน่า และดินบริเวณรากพืชสมุนไพร พบว่า มีเพียง 41 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าวได้ โดยที่แบคทีเรียส่วนใหญ่ (39 ไอโซเลต) แยกได้จากถั่วเน่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค ด้วยแบคทีเรียที่แยกได้ มีค่าอยู่ระหว่าง 25 และ 67.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ผู้วิจัยพบว่า การใช้น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก็มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วย ต่อจากนั้น ผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ดีที่สุด จำนวน 7 ไอโซเลต มาศึกษาเพิ่มเติม โดยมุ่งเน้นการวิเคราะห์สารเมทาบอไลท์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียเหล่านี้ ตลอดจนการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียดังกล่าว

ผู้วิจัยคาดหวังว่า งานวิจัยนี้จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการศึกษาขั้นต้นเพื่อตรวจสอบหาจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. นี้ได้ โดยมุ่งหวังที่จะนำผลที่ได้ไปใช้พัฒนาให้เกิดประโยชน์ได้จริงในภาคสนามต่อไป

[1] School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100, Thailand

[2] Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Introduction

Lasiodiplodia species is one of the major fungal pathogens responsible for postharvest storage rots in various kinds of tropical fruits (Li *et al.*, 1995; Mortuza and Ilag, 1999). When the fruits are infected by *Lasiodiplodia*, the typical symptom is the formation of black spots on the fruit's surface. Traditionally, the use of fungicides (i.e., benomyl) is a common means to control such a disease. Unfortunately, the inappropriate use of these chemicals has resulted in the emergence of resistant strains. In addition, the chemical remains in the fruit products cause a food safety concern to the consumers. As a result, the search for other 'novel' natural substances that do not impose such problems is required and biocontrol may be an alternative to serve this purpose. This study was performed to screen the microbes from natural habitat that are capable of inhibiting the *Lasiodiplodia* species. In a long run, this work is expected to develop as a novel strategy for controlling *Lasiodiplodia* species in the field trial.

Materials and Methods

Microbial cultures. The fungal *Lasiodiplodia* strains were obtained from the Postharvest Technology Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. The bacterial isolates used in antagonistic experiment were isolated from *thua nao* (Thai fermented soybeans) and rhizosphere soils of *Aloe barbadensis*, *Alpinia galanga*, *Centella asiatica*, *Citrus aurantifolia* and *Wedelia trilobata*.

Antifungal activity. The dual culture tests were performed in triplicate by placing the the fungal mycelia and bacterial colony on the centre of the PDA plates. Antifungal activity was observed by the inhibition zone of the mycelial growth. Radial growth reduction was calculated as follows: (a – b) / a (where a = radial growth measurement of the pathogen in control and b is that of the pathogen in the presence of bacteria tested); these values were then expressed as percentage inhibition of radial mycelial growth. To confirm the results, the bacterial-culture supernatants were also used. The test bacterial isolates exhibiting the greatest zones of inhibition were selected for further experiment.

Bacterial identification. The selected bacterial strains were characterised based on their morphological and biochemical properties. These included cell shape, Gram staining, presence of spore, and growth conditions (oxygen and temperature requirements). Biochemical assays were performed as previously described by Norris *et al*. (1981).

Results and Discussion

Postharvest diseases in fruits and vegetables are serious concerns and cause a great loss worldwide; especially in tropical countries, such a loss is estimated to be between 20 – 40% (Daniels, 1990). The fungal pathogen *Lasiodiplodia* species are well known as a causative pathogen of fruit rots under inappropriate storage. Thaiabendazole and benomyl are commonly used fungicides in combating these postharvest diseases. Recently, biocontrol is expected to be a promising strategy for controlling postharvest fruit diseases due to several benefits (i.e., safety concern). However, there is limited work regarding the use of biocontrol for *Lasiodiplodia* (Li *et al.*,

1995; Mortuza and Ilag, 1999). In Thailand, a few reports have been carried out and suggested the potential of antagonistic yeast *Endomycopsis fibuligera* to control this fungal pathogen (Sangchote and Sangwanich, 2006).

Figure 1 Dual culture test between *Lasiodiplodia* species and bacteria tested. Left, the mycelia growth of *Lasiodiplodia*; right, the inhibition of mycelia growth by bacterial isolates.

In this study, a total of 281 bacterial isolates obtained from *thua nao*, the Thai fermented soybeans (170 isolates) and rhizosphere soils of five medicinal plants (111 isolates) were used to test against the fungal pathogen *Lasiodiplodia*. Based on dual test (Figure 1), it was found that 39 strains from *thua nao* exhibited antagonistic activity between 25 – 67.5% whereas there were only 2 isolates from rhizosphere soils showing such an activity (45 and 50%). Further experiment was then confirmed using the bacterial-culture supernatant. For this, there were 37 *thua nao* bacterial isolates (17.3 – 52%) and 2 rhizosphere soil bacteria (35.7 and 52.4%) that were able to inhibit the fungal growth. Seven best bacterial strains were selected based on their high inhibitory ability (see Table 1).

Based on cell morphology, all isolates were Gram-positive, endospore-forming bacilli. Further study is now being undertaken to determine the identity of the active compound(s) and the microbial source. These preliminary results prove to be the most promising step before the field trial.

Table 1 Selected bacterial strains isolated from *thua nao* (TN) and rhizosphere soils (RS) exhibiting inhibitory effect on *Lasiodiplodia* growth. The percentage of inhibition calculated as described in the Materials and Methods Section is shown.

Bacterial isolates	Inhibition activity (%)
RS5	52.4
TN79	52
TN112	52
TN117	51.2
TN142	49.4
TN133	47.6
RS3	35.7

References

Daniels, S. 1990. Export development through postharvest quality improvement. Asia Pacific Food Ind. 2: 40-46.

Li, H-Y., R-B. Cao and Y-T. Mu. 1995. *In vitro* inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. Crop Prot. 14: 187-191.

Mortuza, M. G. and L. L. Ilag. 1999. Potential for biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. Biol. Control 15: 235-240.

Norris, J. R., R. C. W. Berkeley, N. A. Logan and A. G. O'Donnell. 1981. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: *The Prokaryotes Vol. 2* (Edited by Starr, M. P., A. Stolp, A. G. Truper, A. Balows and H. G. Schlegel). Springer-Vertag, Berlin. pp. 1711-1742.

Sangchote, S. and S. Sangwanich. 2006. Selection and screening antagonistic yeasts to control crown rot of banana cv. Kluai Hom Thong, caused by *Lasiodiplodia theobromae*. Proc. the 3rd National Technical Seminar on Postharvest / Post Production Technology. October 2005. Petchaburi, Thailand. p. 59-69.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวกาญจนา นิรภัย
วัน เดือน ปี เกิด	24 พฤษภาคม 2517
ประวัติการศึกษา	
ระดับปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2539
ประวัติการทำงาน	พ. ศ. 2546 - 2548 พนักงานบริษัท OV CHEMICAL&SUPPLY, UNION SCIENCE CO., LTD. พ. ศ. 2541 - 2544 เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ บริษัทกรุงเทพ พยาธิ – แล็ป จำกัดโครงการวิจัยวัคซีนป้องกันโรคเอดส์ระยะที่1และ2 ร่วมกับสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, McKesson Bioservices Corporation (MBS), USA และ Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), USA พ. ศ. 2540 - 2541 นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ. ศ. 2539 - 2540 พนักงานวิทยาศาสตร์ บริษัท เค การเกษตร จำกัด
ประวัติการฝึกอบรมสัมมนา	10 - 12 ตุลาคม 2549, เข้าร่วมการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 32 นำเสนอผลงานแบบบรรยาย ในหัวข้อ Biocontrol of *Lasiodiplodia* spp. by *Bacillus* Species Isolated from *Thua Nao*. 22 - 25 พฤษภาคม 2550 เข้าร่วมประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องการตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย Clinical Gram negative bacilli คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

9 - 12 ตุลาคม 2550, เข้าร่วมการประชุมวิชาการนานาชาติประจำปีของสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทยครั้งที่ 19 นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในหัวข้อ Potential biocontrol agents of *Lasiodiplodia theobromae* from *Bacillus* species isolated from *Thua Nao*.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 37 ฉบับที่ 6 พฤศจิกายน - ธันวาคม 2549 เรื่อง Biocontrol of *Lasiodiplodia* spp., the fungal causative agent of postharvest diseases.